

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tea Petrović

Utjecaj indeksa tjelesne mase na ishod postupka
izvantjelesne oplodnje u žena

Diplomski rad

Zagreb, 2016. godina

Ovaj rad je izrađen u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom dr. sc. Patrika Stanića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvale

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr. sc. Patriku Staniću, na njegovom vodstvu, korisnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Nadalje, želim se zahvaliti izvr. prof.dr.sc Vesni Benković na njezinoj susretljivosti, što je pristala biti su-voditeljica ovog rada.

Želim se zahvaliti i svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene te su svojim prisustvom razdoblje studiranja učinili zabavnim i nezaboravnim.

Na kraju, najveću zahvalnost za svoja postignuća pripisujem svojim roditeljima, bratu i sestri na njihovu bezuvjetnoj podršci, strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Veliko Hvala svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj indeksa tjelesne mase na ishod postupka izvantjelesne oplodnje u žena

Tea Petrović

Roseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Medicinski pomognuta oplodnja (MPO) je visoko specijalizirana grana medicine kojom se liječi neplodnost u slučajevima kada se uzroci neplodnosti ne mogu otkloniti, već se moraju zaobići. *In vitro* oplodnja (engl. *in-vitro fertilisation* - IVF) postupak je kojim su jajne stanice oplodene spermijima izvan maternice. Ovom postupku liječenja neplodnosti pribjegava se kada su ostale metode pomognute oplodnje bezuspješne. Liječenje neplodnosti uključuje kontroliranje ovulacije hormonima, vađenje (punkcija) jajnih stanica iz jajnika žene i ostavljanje spermija da oplode jajnu stanicu u hranjivom mediju. Zametak se tada vraća (transferira) u maternicu pacijentice s namjerom da se postigne trudnoća. Pretilost i prekomjerna težina jedan su od vodećih zdravstvenih problema u svijetu. Pretilost ima nekoliko ozbiljnih posljedica za zdravlje, uključujući hipertenziju, šećernu bolest (*Diabetes mellitus*), kardiovaskularne bolesti, karcinom maternice i karcinom dojki. Također ima negativan utjecaj na reproduktivno zdravlje. Pretjerana tjelesna težina dovodi do menstrualnih disfunkcija, odnosno do anovulacije i neplodnosti. Prekomjerna težina ima utjecaj na kvalitetu jajne stanice, razvoj embrija, broj zrelih jajnih stanica te je potrebna veća doza gonadotropina tijekom stimulacije. Cilj ovog istraživanja je odrediti utjecaj indeksa tjelesne mase na ishod trudnoća u žena nakon postupaka izvantjelesne oplodnje. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da BMI utječe na ishod trudnoće.

(50 stranica, 24 slike, 3 tablice, 31 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: neplodnost, BMI, IVF, ICSI

Voditelj: dr. sc. Patrik Stanić, Klinika za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra, Zagreb

Suvoditelj: izv.prof.dr.sc. Vesna Benković, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
Ocjenitelji:

dr.sc. Vesna Benković, izv. prof.

dr.sc. Gordana Lacković-Venturin, prof.

dr.sc. Antun Alegro, izv. prof.

dr.sc. Duje Lisičić, doc.

Rad prihvaćen:

8.9.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Effect of body mass index on *in vitro* fertilization outcomes in women

Tea Petrović

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Assisted reproductive technology (ART) is a highly specialized branch of medicine which treats infertility in cases where the cause of infertility cannot be eliminated, but must be bypassed. *In vitro* fertilization (*in-vitro fertilization*, IVF) is a technique in which oocyte are fertilized by sperm outside the womb. This procedure of infertility treatment is resorted to when other methods of assisted reproduction fail to succeed. Infertility treatment includes hormonal control of ovulation, extraction (puncture) of oocytes from ovaries of women and enabling sperm to fertilize the oocyte in a nutrient medium. It is embryo transfer in order to achieve pregnancy. Obesity and overweight are one of the leading health problems in the world. Obesity has a number of serious health effects, including hypertension, diabetes (Diabetes mellitus), cardiovascular disease, uterine and breast cancer. It also has a negative impact on reproductive health. Excess weight leads to menstrual dysfunction, or to anovulation and infertility. Excess weight has an impact on the quality of oocytes, embryo development, and the number of mature oocytes and requires higher doses of gonadotropins during the stimulation. The aim of this study was to determine the effect of body mass index on *in vitro* fertilization outcomes in women. The results of our research showed that there is a relationship between BMI and the outcome of pregnancy rate.

(50 pages, 24 pictures, 3 tables, 31 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: infertility, BMI, IVF, ICSI

Supervisor: dr. sc. Patrik Stanić, Clinic for Gynecology and Obstetrics, University Hospital Center, Zagreb

Co-supervisor: izv.prof.dr.sc. Vesna Benković, Division of Biology, Faculty of Science University of Zagreb, Croatia

Reviewers:

dr.sc. Vesna Benković, izv. prof.

dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, prof.

dr. sc. Antun Alegro, izv. prof.

dr.sc. Dujie Lisčić, doc.

Thesis accepted: 8 September 2016

POPIS KRATICA

BMI- Indeks tjelesne mase (*engl. Body Mass Index*)

CCCT- Klomifen citrat test (*engl. clomiphene citrate challenge test*)

CNS- Središnji živčani sustav (*engl. Central neural system*)

DNA- Deoksiribonukleinska kiselina (*engl. Deoxyribonucleic acid*)

E2- Estradiol

ET- Prijenos zametaka (*engl. Embriotransfer*)

FSH- Folikulostimulirajući hormon (*engl. Follicle-stimulating hormone*)

GnRH- hormon koji oslobađa gonadotropine (*engl. Gonadotropni releasing hormone*)

hCG- Humani korionski gonadotropin (*engl. Human chorionic gonadotropin*)

HIV- Virus humane imunodeficijencije (*engl. Human immunodeficiency virus*)

hMH- Ljudski menopauzalni hormon (*engl. Human menopausal hormone*)

ICSI- Intracitoplazmatska injekcija spremija (*engl. Intracytoplasmic sperm injection*)

IGF1- Inzulinu sličan faktor rasta 1 (*engl. insulin-like growth factor 1*)

IVF- *In vitro* oplodnja (*engl. in-vitro fertilisation*)

LH- Hormon luteinizacije

MPO- Medicinski pomognuta oplodnja (*engl. Assisted reproductive technology*)

PCOS- Sindrom policističnih jajnika (*engl. Polycystic Ovary Syndrome*)

PVP- Polivinilpirolidon

recFSH- Rekombinantni folikulo-stimulirajući hormon (*engl. Recombinant follicle stimulating hormone*)

SHBG- Globulin koje veže spolne hormone (*engl. Sex hormone-binding globulin*)

TRH- Hormon koji oslobađa tireotropin (*engl. Thyrotropin-releasing hormone*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organisation*)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Sustav ženskih splonih hormona	1
1.2. Utjecaj pretilosti na regulatorne hormone	3
1.3. Steroidni hormoni	3
1.4. Inzulin	4
1.5. Leptin	7
1.6. Opis jajne stanice	9
1.7. Pretilost i jajne stanice	12
1.8. Osnovna građa spermija	13
1.9. Medicinski pomognuta oplodnja	15
1.10. Opis IVF postupka	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. MATEIJALI I METODE	19
3.1. Ispitanici	19
3.1.1. Klinička obrada ispitanika	19
3.2. Priprema prije aspiracije folikula	19
3.3. Izolacija jajne stanice	19
3.4. Identifikacija jajne stanice	20
3.5. Obrada spermija	21
3.5.1. Određivanje ukupnog broja pokretnih spermija u ejakulatu	21
3.5.2. Određivanje morfoloških karakteristika spermija	21
3.5.3. Obrada spermija postupkom isplivavanja spermija	22
3.6. Priprema za ICSI postupak	23
3.6.1. ICSI postupak	23
3.6.2. Ocjena fertilizacije nakon oplodnje jajnih stanica ICSI metodom	25
3.7. Priprema za ocjenu fertilizacije	26
3.7.1. Ocjena fertilizacije nakon oplodnje jajne stanice IVF metodom	26
3.8. Kultura i ocjena ranih zametaka	28
3.9. Kultura i ocjena blastocista	30
3.10. Prijenos zametaka u materijšte ili embriotransfer	31
3.11. Statistička obrada	32
4. REZULTATI	33
5. RASPRAVA	40
6. ZAKLJUČAK	43
7. LITERATURA	44
8. ŽIVOTOPIS	48

1. UVOD

Reproduksijske funkcije u žene mogu se podijeliti u dvije faze, priprema ženskog tijela za začeće i trudnoću i sama trudnoća. Glavni reproduksijski organi u žena su jajnici, jajovodi, maternica i rodnica. Reprodukcijska počinje razvojem jajne stanice u jajovodu. Tijekom cijelog reproduksijskog razdoblja odrasle žene, koje traje približno od 13. do 46. godine života, 400 do 500 folikula se razviju da izbace svoja jajašca, po jedno svaki mjesec, a ostali degradiraju (Guyton i Hall, 2012).

1.1. Sustav ženskih spolnih hormona

Sustav ženskih spolnih hormona sastoji se od triju hijerarhijskih hormonskih razina:

a) HIPOTALAMIČKI OSLOBAĐAJUĆI HORMON: hormon koji oslobađa gonadotropine (*engl. Gonadotropni releasing hormone, GnRH*)

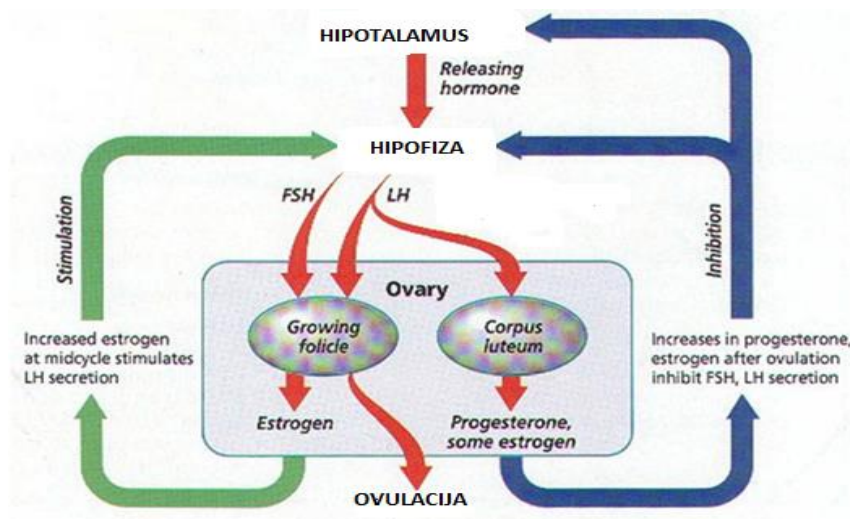
Živčani signali iz mediobazalnoga dijela hipotalamusa, iz arkuatnih jezgara, uzrokuju valovito oslobađanje GnRH koji potiče valovito oslobađanje folikulostimulacijskog (*engl. Follicle-stimulating hormone, FSH*) i hormon luteinizacije (*engl. Luteinizing hormone, LH*) iz adenohipofize. Hormon koji oslobađa gonadotropine (GnRH) po strukturi je deka-peptid.

b) SPOLNI HORMONI ADENOHIPOFIZE: FSH i LH.

FSH i LH luče se kao odgovor na oslobađajući hormon GnRH iz hipotalamusa. Folikulostimulacijski i luteinizacijski hormon po strukturi su peptidi (glikoproteini).

c) HORMONI JAJNIKA: estrogeni i progesteron

Estrogeni i progesteron jajnici luče na poticaj dvaju gonadotropnih hormona adenohipofize. Estrogeni i progesteron steroidni su hormoni koji se sintetiziraju iz kolesterola (Guyton i Hall, 2012).



Slika 1. Sustav ženskih spolnih hormona

(preuzeto sa: http://static.flickr.com/31/56174461_8d71eed31d.jpg?v=0)

Postoje dvije vrste spolnih hormona jajnika, estrogini i progestini. Estrogini uglavnom potiču proliferaciju i rast specifičnih tjelesnih stanica, koje su odgovorne za razvoj većine sekundarnih ženskih spolnih obilježja. U plazmi žene znatnije su količine triju estrogena: β -estradiola, estrona i estriola. Najvažniji estrogen što ga luče jajnici je hormon β -estradiol. Progestini uglavnom sudjeluju u pripremi maternice za trudnoću i dojki za laktaciju. Najvažniji progestin je hormon progesteron koji se luči tijekom druge polovice svakog ovarijskog ciklusa, a luči ga žuto tijelo. Velike količine progesterona luči i posteljica za vrijeme trudnoće (Guyton i Hall, 2012).

Povećana sekrecija LH i povećan omjer LH:FSH omjer su pokazali da se nepovoljni u folikulogenezi. Gubitak težine dovodi do smanjenje razine LH kod pacijenata s policističnim jajnicima (*engl. Polycystic Ovary Syndrome, PCOS*). Međutim, u mršavih žena s PCOS, povišena razina LH glavna je patofiziološka značajka koja vodi do hiperandrogenemije. Nasuprot tome, u pretilih žena s PCOS, to povišuje inzulinsku rezistenciju te ima učinak na razvoj folikula i ovulaciju (Ozekinci i sur., 2015).

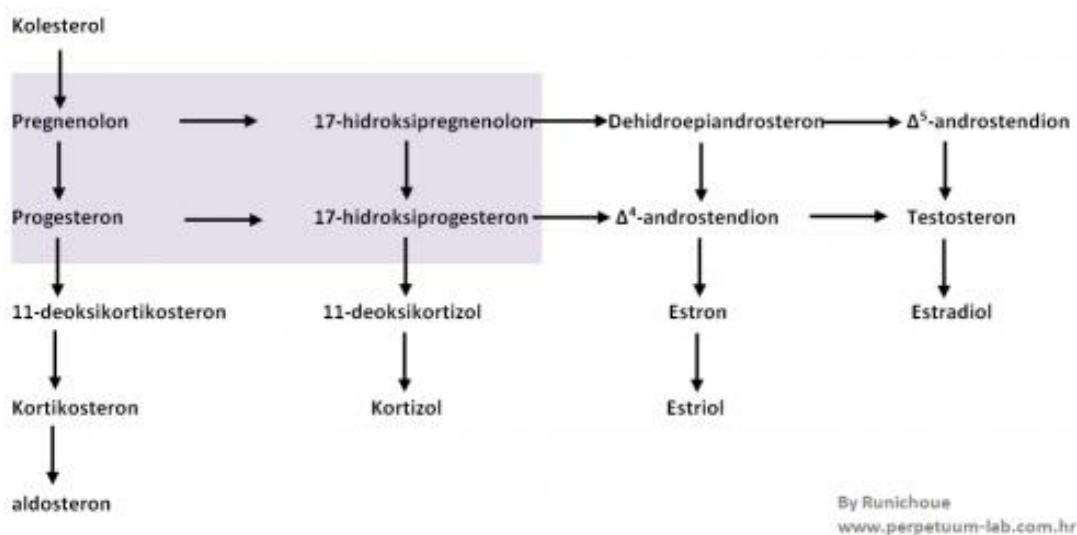
1.2. Utjecaj pretilosti na regulatorne hormone

Masno tkivo i njegove temeljne jedinice, adipociti, energetska su pričuva i odgovorni su za održavanje energetske ravnoteže. Dugo vremena se smatralo da je masno tkivo samo pasivni rezervoar za skladištenje masti i energije te da služi kao potporno tkivo i toplinski izolator (<http://zdravlje.eu/2011/04/13/bijelo-masno-tkivo/>). Danas se zna da je ono bitan i aktivan, metabolički i endokrini organ. Osim što masno tkivo eksprimira brojne receptore koji omogućuju da se odgovori na aferentne signale iz tradicionalnih hormonskih sustava kao i središnjeg živčanog sustava (CNS), ono eksprimira i izlučuje različite bioaktivne peptide poznate kao adipokini, koji djeluju na lokalnoj (autokrino/parakrino) i na sistemskoj razini (endokrino). Među njih spadaju leptin, adiponektin, komponente komplemента, inhibitor aktivatora plazminogena-1, proteini renin-angiotenzin sustava, rezistin i drugi. Oni sudjeluju u regulaciji apetita i energetskog balansa, imunosti, inzulinske osjetljivosti, angiogeneze, krvnog tlaka, metabolizma lipida i homeostaze. Masno tkivo je također jedno od glavnih mjesta za metabolizam spolnih steroida i glukokortikoida (Galic i sur., 2009). Prema tome, osim biološke potrebe za pohranjivanjem i oslobađanjem energije, adipozno tkivo sadrži metaboličku „mašineriju“ koja omogućuje komunikaciju sa udaljenim organima uključujući CNS. Kroz ovu interaktivnu mrežu, masno tkivo je integralno uključeno u koordinaciju raznih bioloških procesa, uključujući metabolizam energije, neuroendokrinu funkciju i imunološke reakcije (Kasim i Roshdy, 2014). Također različiti hormoni utječu na menstrualni ciklus, ovulaciju i razvoj endometrija. Pokazalo se da pretilost može poremetiti tu ravnotežu preko izravnih i neizravnih mehanizama. Masno tkivo ometa lučenje spolnih hormona i njihovu bioraspoloživost, a djeluje na razine leptina, inzulina i steroidnih hormona (Brewer i Balen, 2010).

1.3. Steroidni hormoni

Masno tkivo je važno mjesto proizvodnje i metabolizma steroidnih hormona. Tu se vrši pretvorba androgena u estrogen, estradiol i estron. Estrogeni i progestini steroidni su hormoni koji se sintetiziraju u jajnicima, uglavnom od kolesterola koji potječe iz krvi. U tijeku sinteze najprije se sintetiziraju progesteron i androgeni (testosteron i androstendion). U granuloznim stanicama, tijekom folikularne faze ovarijskog ciklusa, enzim aromataza pretvara androgene u estrogene. Estrogeni i progesteron prenose se krvlju vezani uz bjelančevine plazme. Razgradnja estrogena i progesterona odvija se u jetri (Guyton i Hall, 2012).

Osim toga, masno tkivo sudjeluje u kontroli bioraspoloživosti hormona preko transportnih proteina i utječe na vezivanje steroidnih hormona u masnom tkivu. To kod pretilih žena dovodi do promijenjene isporuke androgena i estrogena do ciljnih organa (Leary i sur., 2015). Serumska koncentracija globulina koji veže spolne hormone (*engl. Sex hormone-binding globulin, SHBG*) niža je u pretilih žena (Nichols i sur., 2003). Koncentracija serumskog SHBG se povećava se djelovanjem estrogena i gonadotropina, a smanjuje djelovanjem inzulina i androgena. Kod pretilosti dolazi do smanjenja razine SHBG. Raspodjela masnog tkiva ima značajan utjecaj na koncentracija SHBG u serumu. Centralna (visceralna) debljina dovodi do smanjenjene koncentracije u serumu, dok periferna pretilost povećava koncentracije SHBG u serumu (Brewer i Balen, 2010.).



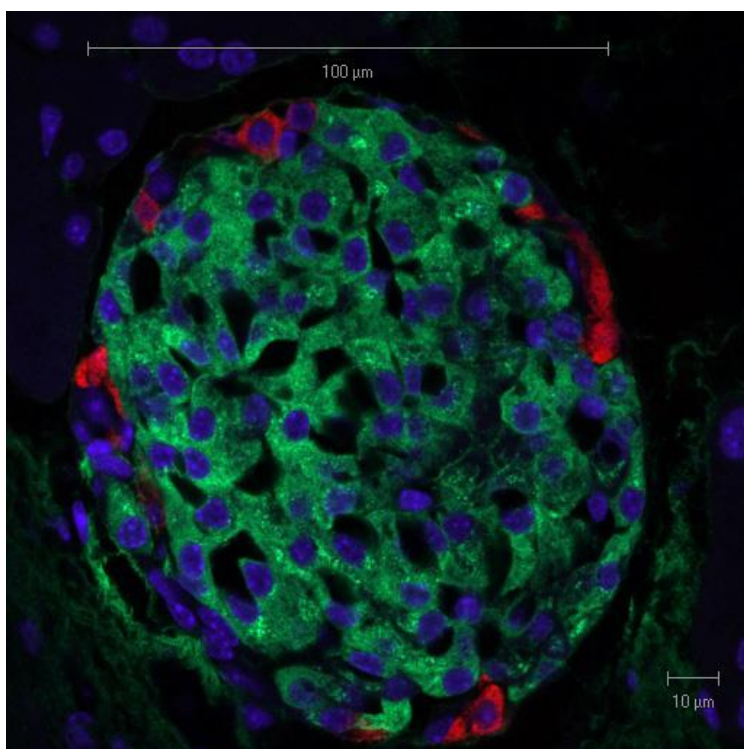
Slika 2. Sinteza estrogena i progesterona

(preuzeto sa: <https://www.perpetuum-lab.com.hr>)

1.4. Inzulin

Inzulin je peptidni hormon koji proizvode beta stanice Langerhansovih otočića gušterače (Slika 3), a regulira metabolizam ugljikohidrata i masti. Dva su načina na koji djeluje: (i) ekscitacijski (npr. poticanje apsorpcije glukoze iz krvi u stanice te sinteze i pohrane masti) i (ii) inhibitorno, inhibirajući lipolizu, proteolizu, glikogenolizu, glukoneogenezu i ketogenezu (Sonksen i sur., 2000). Molekula inzulina sastoji se od dva polipeptidna lanca, A i B, povezana disulfidnim mostom. Najprije se sintetizira kao preproinzulin koji se sastoji od samo jednog lanca i sadrži signalni peptid koji usmjerava nascentni lanac na hrapavi endoplazmatski retikulum. Kad se otcijepi signalni peptid nastaje proinzulin. U hrapavom endoplazmatskom retikulumu on se smata u konformaciju s tri disulfidna mosta te zatim

prenosi u Golgijev aparat gdje se najprije formiraju nezrele granule (Sonksen i sur., 2000). Sazrijevanje proinzulina u inzulin kataliziraju stanične endopeptidaze konvertaze prohormona PC1 i PC2 te egzoproteaza karboksipeptidaza E. Nakon cijepanja oslobađa se fragment nazvan C-peptid i ostaju lanci A i B povezani disulfidnim mostom. Zreli se inzulin pakira u vezikule koje se fuzioniraju sa staničnom membranom nakon aktivacije signalnog puta za sekreciju inzulina (Steiner, 2008).

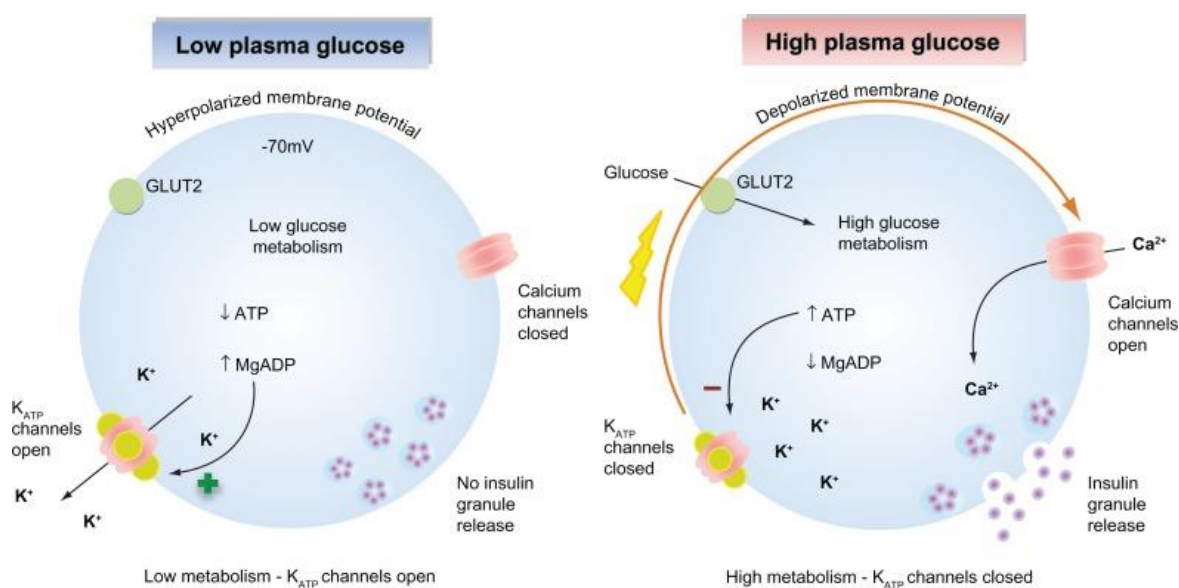


Slika 3. Langerhansov otočić gušterače miša vizualiziran fluorescencijskom svjetlosnom mikroskopijom. β -stanice se mogu prepoznati po inzulinu obilježenom zelenom fluorescencijom. Jezgre stanica su obojane plavo, a glukagon crveno. (preuzeto sa: Solimena Lab, Med. Fac., University of Technology, Dresden, Germany)

Proizvodnju i oslobađanje inzulina potiču povišena razina proteina i glukoze u krvi nakon probave hrane. Jedan do tri milijuna Langerhansovih otočića formira endokrini dio gušterače koja je inače primarno egzokrina žlijezda, čineći ukupno oko 2% mase gušterače. β -stanice unutar njih su odgovorne za proizvodnju inzulina, a za signalni put sekrecije ključni su ionski kanal za kalcij reguliran naponom i ionski kanal za kalij osjetljiv na ATP (Slika 4). Oni se nalaze unutar stanične membrane β -stanica i u stanju mirovanja ionski kanali za kalij su otvoreni, a kanali za kalcij zatvoreni. Ioni kalija difundiraju iz stanice u smjeru koncentracijskog gradijenta zbog čega unutrašnjost stanice postaje negativno nabijena u

odnosu na izvanstanični prostor. Razlika potencijala na membrani u mirovanju iznosi -70mV (Lang i Light, 2010).

Kada razina glukoze u krvi dosegne normalnu fiziološku vrijednost, otpuštanje inzulina iz β -stanica se uspori ili stane. Ako razina glukoze padne niže od fiziološke vrijednosti, otpuštanje hiperglikemičkih hormona poput glukagona iz α -stanica Langerhansovih otočića potiče otpuštanje glukoze u krv iz staničnih zaliha, primarno iz jetrenog glikogena (Rhoades i Bell, 2009). Na taj se način sprečava hipoglikemija kako bi stanice središnjeg živčanog sustava, koje ovise o glukozu kao primarnom izvoru energije, mogle normalno funkcionirati.



Slika 4. Sekrecija inzulina u β -stanicama gušterače inducirana glukozom. (lijevo). Kada je razina glukoze u krvi niska, smanjen omjer ATP/ADP omogućava otvaranje ionskog kanala za kalij ovisnog o ATP-u. Kao posljedica, membrana stanice je hiperpolarizirana i ionski kanali za kalcij ostaju zatvoreni te nema sekrecije inzulina. (desno) Kada je razina glukoze u krvi visoka, glukoza se prenosi u stanicu preko GLUT2 transportera olakšanom difuzijom. Metabolizam glukoze povećava količinu ATP-a što uzrokuje zatvaranje ionskih kanala za kalij, depolarizaciju membrane, otvaranje ionskih kanala za kalcij ovisnih o naponu, ulazak kalcija u stanicu i sekreciju inzulina egzocitozom. (preuzeto sa: Lang i Light, 2010)

Jajnik je ciljani organ za inzulin, gdje inzulin djeluje putem inzulinskog receptora i preko inzulinu sličanom faktoru rasta 1 (*engl. insulin-like growth factor 1, IGF1*) receptora. Ovi receptori su otkriveni u granulози i ovarijskom stromalnom tkivu (Comninou i sur., 2014).

Inzulin stimulira steroidogenezu jajnika u teki (theca) i granuloznim stanicama te pojačava stimulacijski učinak LH preko regulacije LH receptora. Inzulin također djeluje na razini hipofize, gdje povećava osjetljivost gonadotropnih stanica na djelovanje GnRH, što daljnje povećava steroidogenezu jajnika. Odnosno, inzulin modulira biološku raspoloživost steroidnih hormona tako da inhibira sintezu SHBG u jetri (Brewer i Balen 2010). Pretilost, osobito centralna, inducira hiperinzulinemiju i dovodi do inzulinske rezistencije. Kao odgovor na inzulinsku rezistenciju, postoji kompenzacijsko povećanje izlučivanja inzulina. Izmijenjenim metabolizmom inzulina (otpornost na inzulin i hiperinzulinemija) dolazi do smanjenja SHBG, hiperandrogenemije, čime se povećava vjerojatnost menstrualnog i ovulacijskog poremećaj u pretilih žena (Brewer i Balen 2010).

1.5. Leptin

Leptin je polipeptid od 16 kD koji sadrži 167 aminokiselina sa strukturom homolognom citokinima (Comninou i sur., 2014). Adipociti izlučuju leptin proporcionalno masi masnog tkiva i nutritivnom statusu, a to izlučivanje je veće kod subkutanog u odnosu na visceralno masno tkivo. Izlučivanje se povećava s unosom hrane i smanjuje za vrijeme gladi. Ekspresija i ekskrecija leptina također su regulirani različitim drugim čimbenicima. Na primjer, povećanje leptina induciraju inzulin, glukokortikoidi, $TNF\alpha$, estrogeni i protein pojačivač koji se veže na CCAAT slijed, dok smanjenje razine leptina induciraju β 3-adrenergičke aktivnosti, androgeni, slobodne masne kiseline, GH i agonisti γ receptora peroksisoma (Comninou i sur., 2014). Testikularni steroidi smanjuju, a steroidi jajnika povećavaju koncentraciju leptina. Leptin receptori su članovi superobitelji receptora citokina klase I i izraženi su i u CNS-u i na periferiji. Iako je identificirano nekoliko inačica receptora za leptin, dugi oblik posreduje većinu od mnoštva učinaka leptina (Galic, 2009).

Leptin regulira tjelesnu masu, apsorpciju hrane i pohranu masti te ima utjecaj na energetske homeostazu (Gayton i Hall, 2012). Mnogi od tih učinaka posredovano je hipotalamusom, dok drugi učinci imaju izravno djelovanje na periferna tkiva uključujući mišiće i β -stanice gušterače. Iako je leptin u početku promatran kao hormon protiv pretilosti, primarna uloga mu je da služi kao metabolički signal energetske dostatnosti (Brewer i Balen, 2010). Razina leptina naglo opada s kalorijskom restrikcijom i gubitkom tjelesne mase. Ovaj pad je povezan s adaptivnim fiziološkim odgovorima na gladovanje, uključujući povećanje apetita i smanjenje potrošnje energije. Smanjenje signalizacije leptinom ili narušavanje receptorske funkcije povećava unos energije i snižuje utrošak energije. Nedostatak leptina je uzrok teškoj

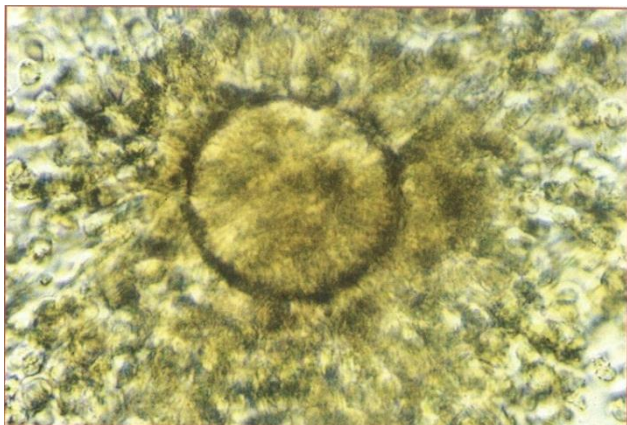
ranoj pretilosti, hipogonadizmu, hiperinzulinemiji, hiperfagiji i smanjenoj imunosti koja je regulirana T limfocitima (Lindenmaier i sur., 2016). Nadalje, ovi odgovori se lako normaliziraju zamjenom niskim dozama leptina. Nasuprot tome, uobičajene oblike pretilosti karakterizira povišenje cirkulirajućeg leptina. Niti visoke razine endogenog leptina niti tretman s egzogenim leptinom nisu učinkoviti u smanjenju apetita i ublažavanju pretilosti, što je u skladu sa stanjem rezistencije na leptin. Mehanizam otpornosti na leptin je nepoznat, ali može biti rezultat oštećenja u signalizaciji, nizvodnih blokada u neuronskim krugovima ili defekata u prijenosu leptina preko krvno moždane barijere (Galic, 2009).

Osim svojih učinaka na energetske homeostazu, leptin normalizira potisnutu razinu hormona štitnjače u leptin-deficijentnih miševa i ljudi, putem stimulacije ekspresije hormona koji oslobađa tireotropin (*engl. Thyrotropin-releasing hormone, TRH*). Leptin ubrzava pubertet kod normalnih miševa i obnavlja normalno izlučivanje gonadotropina i reproduktivne funkcije u leptin-deficijentnih miševa i ljudi. Zamjena leptina za vrijeme posta sprječava promjene inducirane izgladnjivanjem u hipotalamus-hipofiza-gonadaloj i hipotalamus-hipofiza-tiroidnoj osi u zdravih muškaraca. Leptin preko perifernih receptora leptina ima izravne učinke na jajnike, testise, prostatu i placentu (Lindenmaier i sur., 2016).

Nekoliko drugih važnih endokrinih učinaka leptina uključuju regulaciju imunološkog sustava, hematopoeze, angiogeneze i razvoja kostiju. Leptin normalizira potisnuti imunološki sustav povezan s pothranjenošću i nedostatak leptina. Leptin također potiče proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih stanica, mijenja proizvodnju citokina pomoću imunih stanica, potiče rast endotelnih stanica i angiogenezu te ubrzava zacjeljivanje rana (Comninou i sur., 2014). Leptin ima sinergističko djelovanje s fibroblasnim faktorom-2 rasta i faktorom rasta vaskularnog endotela. Povišene koncentracije leptina stvaraju reaktivne vrste kisika te oštećuju endotelne stanice. Lokalizirano djelovanje leptina na krvne žile ometa dostavu kisika i regulatornih tvari i tako narušavaju sazrijevanje jajnih stanica (Brewer i Balen, 2010). Pored svojih djelovanja na energetske homeostazu, leptin očito ima i raznolike endokrine funkcije. Kao rezultat toga, leptin je prototip za sve endokrine hormone dobivene iz masnog tkiva (Galic, 2009).

1.6. Opis jajne stanice

Zrela jajna stanica okružena je *kumulusom ooforusom* veličine 0,5-0,8 cm, dok stanice *korone radijate* strše na sve strane (Slika 5), zbog čega se u svjetlu streomikroskopa jasno vide obrisi jajne stanice (Mačaš, 2004).



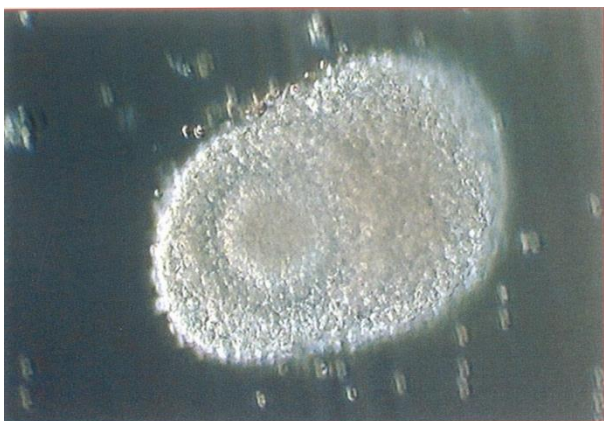
Slika 5. Zrela jajna stanica uklopljena u rahli *kumulus ooforus* s *koronom radijatom* (preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

Kumulus ooforus poluzrelih jajnih stanica je manji od prethodnog, a stanice *korone radijate* su tijesno zbijene jedna uz drugu (Slika 6). Poluzrela jajna stanica uklopljena je u polurahli *kumulus ooforus* s kompaktnom *koronom radijatom* i samo 50 % njih ima izbačeno prvo polarno tjelešće. Nezrela jajna stanica okružena je s dva kompaktna sloja stanica *korone radijate* (Slika 7). Nemaju polarno tjelešće, a u citoplazmi je prisutan zametni mjehurić (Magli i sur., 2012).

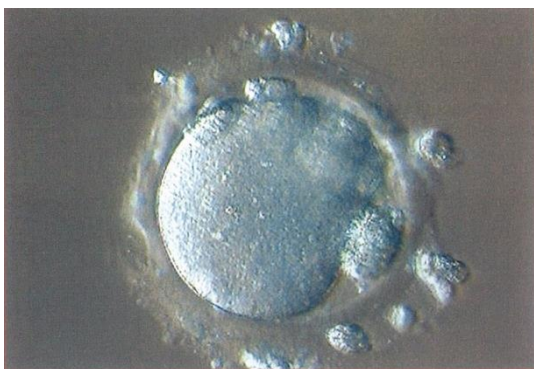
Na kraju, atretična ili degenirirana jajna stanica je smežurana, tamne citoplazme, bez *kumulus ooforusa* i *korone radijate* (Slika 8).



Slika 6. Poluzrela jajna stanica uklopljena u polurahli *kumulus ooforus* s kompaktnom *koronom radijatom* (preuzeto sa: (Magli i sur., 2012)



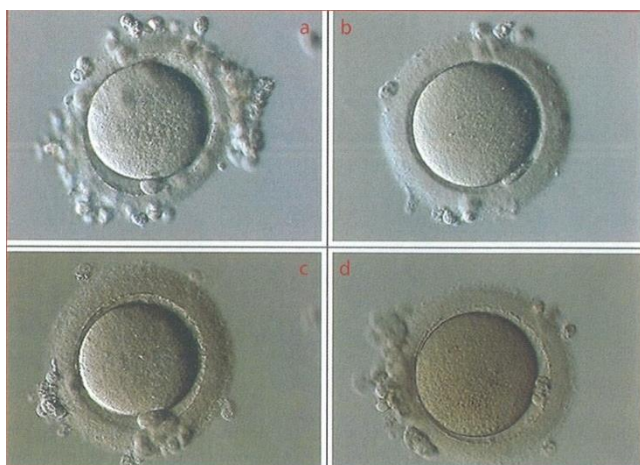
Slika 7. Nezrela jajna stanica s kompaktnim slojem stanica *korone radijate* i *kumulusa ooforusa* (preuzeto sa: Magli i sur., 2012)



Slika 8. Atretična jajna stanica (preuzeto sa: (Magli i sur, 2012)

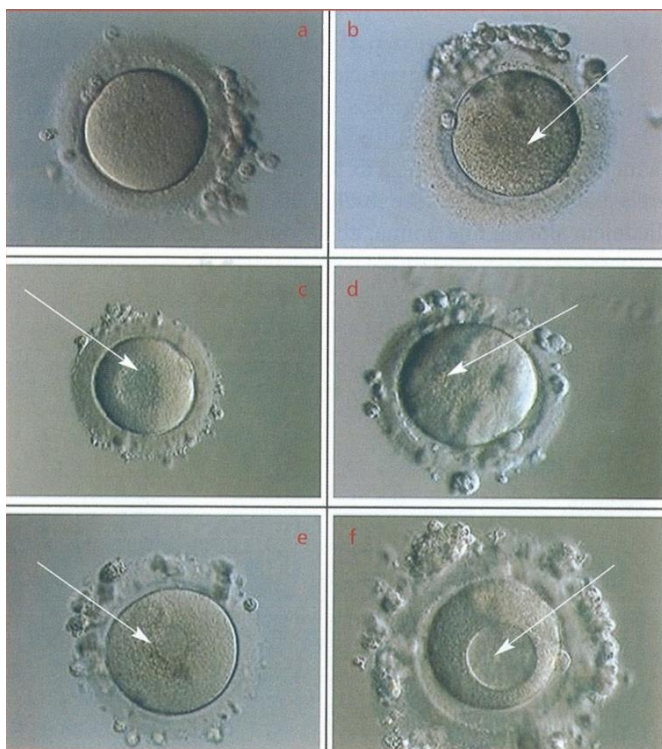
Morfološke karakteristike jajne stanice sagledavamo kada se jajna stanica oslobodni stanica *kumulus ooforusa* i *korone radijate*. To se radi procesom dedundacije, tj. enzimatskom i mehaničkom odstranjenju stanica *kumulus ooforusa* i *korone radijate* (Mačaš, 2004).

Budući da izlaganje hijaluronidazi izaziva partenogenezu, tj. aktivaciju jajne stanice u odsutnosti spermija, ona se u otpini toga enzima ne ostavlja duže od 2-3 minute. Jajna stanica se potom aspirira u kapilare promjera 200 do 150 μm s ciljem da se s njene površine odstrani po mogućnosti što više stanica *korone radijate* (Gardner, 2007). Kada se to učini, sagledavamo konfiguraciju polarnog tjelešca, te opći izgled citoplazme jajne stanice. Polarno tjelešce trebalo bi biti ovalnog oblika i smješteno u sredini perivitelionog prostora. Polarno tjelešce srpastog oblika ukazuje da je jajšce mlado pa su izgledi za oplodnju smanjeni. Također, jajna stanica je prezrela ako je polarno tjelešce rascjepano u više fragmenata (Slika 9) (Mačaš, 2004).



Slika 9. Četiri morfološka oblika polarnog tjelešca: (A) normalno oblikovano polarno tjelešce, (B) polarno tjelešce srpastog oblika; (C) gigantsko polarno tjelešce; (D) fragmentirano polarno tjelešce (preuzeto sa: Mačaš, 2004)

Temeljnim ispitivanjem jajne stanice uočavaju se razlike u općem izgledu citoplazme. Na slici 10. pokraj normalnog tipa stanice sa homogenom citoplazmom, postoje jajne stanice s abnormalnom morfologijom (Slika 10). Za sada se još malo zna o učincima tih anomalija na oplodnju i razvoj embrija, zbog toga ih treba pažljivo evaluirati pri određivanju kvalitete jajne stanice (Sehal i sur., 1997.).



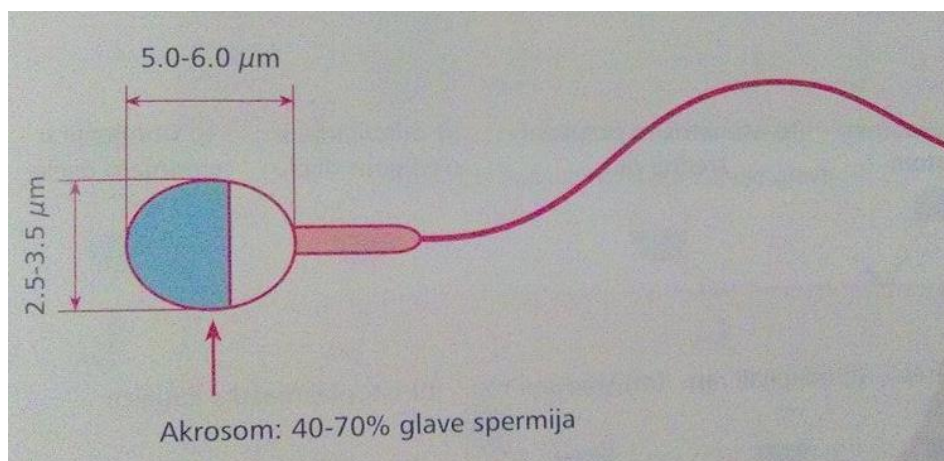
Slika 10. Dismorfizam u jajne stanice čovjeka: (A) normalni tip jajne stanice s homogenom citoplazmom; (B) jajna stanica s granularnom citoplazmom; (C) jajna stanica nazvana „volunjsko oko“; (D) jajna stanica s refraktilim tjelešcem; (E) jajna stanica s glatkim endoplazmatskim retikulumom; (F) jajna stanica s vakuolarnim tipom citoplazme (Preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

1.7. Pretilost i jajne stanice

Dokazano je da prekomjerna težina i pretilost imaju utjecaja na kvalitetu i zrelost jajnih stanica (Brewer i Balen, 2010). Uočeno je da kod žena kojima je indeks tjelesne mase (*engl. Body Mass Index, BMI*) $>30 \text{ kg/m}^2$ potrebna veća doza gonadotropina te se smanjuje broj zrelih jajnih stanica, iako su na početku imale isti broj folikula.

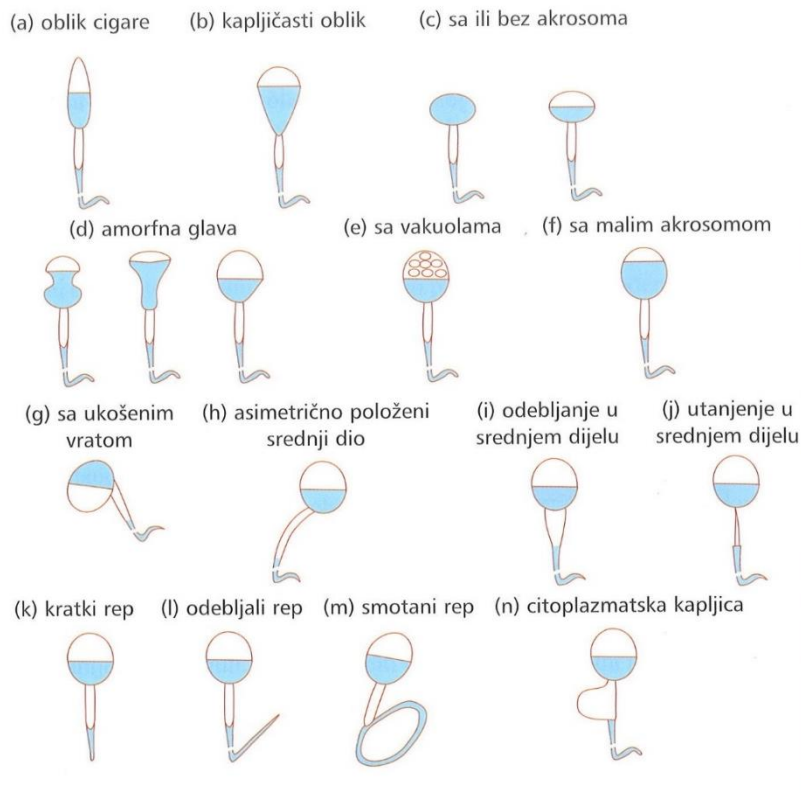
1.8. Osnovna građa spermija

Osnovna građa spermija je glava, vrat, srednji dio i rep. Glava spermija je glatke konfiguracije i ovalnog oblika, s akrosomom koji se proteže na površini od 40 do 70 % ukupne površine glave spermija (Slika 11).



Slika 11. Morfološki normalno oblikovan spermij (preuzeto sa: Mačaš, 2004)

Na svakom od tih dijelova mogu biti anomalije (Gardner, 2007). Prva skupina anomalija se razlučuje na spermije s manjim, i spermije s većim promjenama u glavi. U prvu skupinu spadaju spermiji koji uz normalno oblikovan akrosom imaju poprečni dijamentar glave 2,0 do 2,5 μm , a u drugu spadaju spermiji kojima nedostaje akrosom, ili ako je prisutan proteže se na površini manjoj od 30 %, ili većoj od 70 % ukupne površine glave spermija. Spermiji s nepravilnostima srednjeg dijela razlučuju se na spermije s manjim i većim promjenama. U prvu skupinu spadaju spermiji čiji je vrat neznatno zadebljao, dok u drugu skupinu spadaju spermiji s iskrivljenim vratom (Slika 12) (Mačaš, 2004).



Slika 12. Oblici morfološki abnormalnih spermija čovjeka: (A) nepravilnosti u području glave spermija, (B) nepravilnosti u području vrata i srednjeg dijela spermija, (C) nepravilnosti u području repa spermija (preuzeto sa: Mačaš, 2004)

Ostali atipični oblici spermija, kao što su spermiji s dvije ili više glava, ili s dva ili više repa. Također postoje spermiji sa malom ili velikom glavom (makro i mikrocefalični spermiji) (Slika 13)



Slika 13. Spermiji čovjeka s dvije glave, dva repa (preuzeto sa: <https://www.google.hr/search?q=spermiji+dvije+glave>)

1.9. Medicinski pomognuta oplodnja (MPO)

Medicinski pomognuta oplodnja (MPO) je visoko specijalizirana grana medicine kojom se liječi neplodnost u slučajevima kada se uzroci neplodnosti ne mogu otkloniti, već se moraju zaobići. *In vitro* oplodnja (engl. *in-vitro fertilisation* - IVF) postupak je kojim su jajne stanice oplodene spermijima izvan maternice, odnosno *in vitro* (Mačaš, 2004). To je jedan od najpoznatijih postupaka medicinski potpomognute oplodnje, kojih ima dvadesetak vrsta. Ovom postupku liječenja neplodnosti pribjegava se kada su ostale metode potpomognute oplodnje bezuspješne. Neplodnost je bolest reproduktivnog sustava, odnosno izostanak kliničke trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih odnosa (WHO). Liječenje neplodnosti uključuje kontroliranje ovulacije hormonima, vađenje (punkcija) jajnih stanica iz jajnika žene i ostavljanje spermija da oplode jajnu stanicu u tekućem mediju. Zametak se tada vraća (transferira) u maternicu pacijentice s namjerom da se postigne trudnoća (Gardner, 2007).

Pretilost i prekomjerna težina jedan su od vodećih zdravstvenih problema u svijetu. Pretilost ima nekoliko ozbiljnih posljedica za zdravlje, uključujući hipertenziju, *diabetes mellitus*, kardiovaskularne bolesti, karcinom materice i karcinom dojki (Leary, 2014). Također ima negativan utjecaj na reproduktivno zdravlje. Pretjerana tjelesna težina dovodi do menstrualnih disfunkcija, odnosno do anovulacije i neplodnosti. Pretilost dovodi do hipeinsulinemije što za posljedicu ima ovarijski hiperandrogenizam, odnosno pretjerano stvaranje androgena (Ozekinci, 2015).

Pretilost je povezana sa smanjenom plodnošću, smanjenom stopom ovulacije, također povećava se vrijeme do začeća, a dovodi do povećane stope pobačaja. K tome, povećava se stopa komplikacija u trudnoći, uključujući gestacijsku hipertenziju, gestacijski dijabetes, postpartum krvarenje i fetalne makrosomije (Ozekinci, 2015). Prekomjerna težina ima utjecaj na kvalitetu jajnih stanica, razvoj embrija, broj zrelih jajnih stanica te je potrebna veća doza gonadotropina tijekom stimulacije i sama stimulacija duže traje (Sathya, 2010). Sve više se istražuje kakav ishod ima povećan indeks tjelesne mase na IVF tretmane.

Prekomjerna težina kod žena koje idu na pomognutu oplodnju povezana je nižim s stopama trudnoće te ima niže živih poroda. Osim toga, parovi u kojima su oba partnera pretili imaju povećani rizik od smanjene plodnosti (Kasim, 2014). Pretilost je također povezana s teškoćama u muškoj reproduktivnoj funkciji. Istraživanja su pokazala da je BMI kod

muškaraca obrnut u odnosu na razine androgena i pozitivno se odnose na razine estrogena. Više razine estrogena imaju štetno djelovanje na sekreciju endogenog gonadotropina, jer ometaju djelovanje GnRH. Osim toga, prekomjerna težina i pretilost kod muškaraca pretilost povezane su s lošijom kvalitetom sjemena, veća oštećenja DNA sperme i neplodnosti (McClamrock, 2008).

Prekomjerna težina i pretilost definiraju se preko indeksa tjelesne mase (*eng. Body Mass Index, BMI*) i klasificiraju se u tri grupe: $<25 \text{ kg/m}^2$ (normalna težina), $25\text{--}30 \text{ kg/m}^2$ (prekomjerna težina) i $>30 \text{ kg/m}^2$ (pretilo). Osim utjecaja na reproduktivno zdravlje prekomjerna tjelesna težina tijekom trudnoće korelira s povećanom težinom kasnije u životu. Epidemiološke studije pokazuju kako je tjelesna težina kod začeca i debljanje tijekom trudnoće povezano s povećanim rizikom od kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti potomaka u kasnijem životu (Nichols i sur., 2003).

Folikul jajnika osigurava hranjive tvari za razvoj jajne stanice. Na primjer, glukoza u folikularnoj šupljini prevodi se u piruvat pomoću *kumulus stanica* koje okružuju jajnu stanicu. Osim toga jajna stanica sisavaca sadrže značajno spremište triglicerida, koji služe kao izvor metaboličke energije za sazrijevanje jajne stanice. Okoliš folikula jajnika drugačiji je u pretilih žena. Kod njih su povećane razine triglicerida, glukoze i inzulina, što dovodi do fenotipskih promjena jajne stanice. Na primjer, izloženost goveđih jajnih stanica u okolišu sa visokim masnoćama tijekom dozrijevanja smanjuje se održivost embrija nakon oplodnje te se mijenja metabolička aktivnost u blastocista (Brewer i Balen, 2010).

Prije IVF postupka potrebno je napraviti evaluaciju infertilnih parova da bi se dobio što bolji ishod i smanjile komplikacije. Većina IVF centara imaju protokole za evaluaciju koje koriste prije samog postupka (Gardner, 2007).

Prijašnja studija su pokazala da je kod starijih žena, folikularno sazrijevanje jako brzo i da je folikostimulirajući hormon (FSH) tri dana nakon stimulacije smanjen (Coelho i sur., 2016). Uz FSH mjeri se i razina estradiola (E2), te se određuje sekundarni broj folikula sa transvaginalnim ultrazvukom. Ovo je bitno jer se broj folikula smanjuje s godinama (Brewer i Balen, 2010). Žena koja ima 5-10 folikula iz svakog jajnika, očekuje se da će imati dobar odgovor na stimulaciju. Više od 10 folikula iz svakog jajnika ili manje od 5 folikula dovodi do lošije prognoze i onda se treba sama stimulacija prilagoditi na temelju težine i količine FSH. Sekundarni broj folikula najbolji je pokazatelj ovarijskog odgovora i pomaže u daljnoj prognozi. Uspjeh IVF postupka je niži kod žena iznad 40 godina i koje imaju manje od tri

folikula nakon stimulacije, stoga se broj folikula kombinira s ostalim parametrima (godine, trajanje infertilnosti, razine FSH) kako se našla najbolja opcija za liječenje (Gardner, 2007).

Klomifen citrat test (*engl. clomiphene citrate challenge test, CCCT*) koristi se za identifikaciju pacijentica koje imaju normalnu razinu FSH 3 dan, no imaju slabiji ovarijski odgovor. CCCT se uzima od 5 do 9 dana stimulacije. Kod normalnih žena FSH je stimuliran CCCT, razina E2 vraća se u normalu. Kod žena koje imaju slabiji ovarijski odgovor, hipofiza povisuje razine FSH ali razina E ostaje niska (Gardner, 2007).

Žene koje imaju PCOS proizvede više folikula sa stimulacijom, dobije se više jajnih stanica, ali imaju slabiji fertilizacijski stupanj. Sama prognoza trudnoće ista je kao i kod drugih žena koje se podvrgavaju IVF postupku (Ku i sur., 2006).

Također na ishod IVF postupka utječu i spolno prenosive bolesti kao što su klamidija, hepatitis i virus humane imunodeficijencije (*engl. Human immunodeficiency virus, HIV*). Uz bolesti i osobne navike kao što je pušenje, stres, anksioznost i depresija smanjuju uspješnost IVF postupka (Ku i sur., 2006).

1.10. Opis *in vitro* fertilizacije

In vitro fertilizacija (IVF) je postupak koji uključuje fertilizaciju jajne stanice izvan tijela. Oplodnja izvan tijela složeni je proces koji zahtjeva laboratorij za kulturu tkiva u kojem se primjenjuju aseptički uvjeti rada. U njemu se nosi sterilna odjeća i obuća, maska i kapa, a ruke se peru u blagoj otopini sredstva za dezinfekciju, nakon čega se stavljaju rukavice. Radna površina čisti se 70 % alkoholom. Da bi se spriječila kontaminacija medija bakterijama i gljivicama koriste se bezprašne komore (Gardner, 2007).

Nakon aspiracije i vremena potrebnog za dozrijevanje (jedan do četiri sata) jajne stanice se inseminiraju koncentratom progresivno pokretnih spermija dobivenim obradom sjemeni. Za inseminaciju je potrebno 50 000 do 100 000 pokretnih spermija po jajnoj stanici, stoga se prema koncentraciji obrađenih progresivno pokretnih spermija određuje volumen koncentrata potreban za inseminaciju. U besprašnoj komori sa grijanom plohom koristeći propipetu sa sterilnim nastavkom uzima se točno određeni volumen pokretnih spermija i pod mikroskopom se inseminiraju jajne stanice, koje se odmah potom odlažu nazad u inkubator na 6,0 % CO₂ i 37°C do ocjene fertilizacije sljedećeg dana (Gardner, 2007).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je odrediti utjecaj indeksa tjelesne mase na ishod trudnoća u žena nakon postupaka izvantjelesne oplodnje. Također, odredit ćemo utjecaj različitog indeksa tjelesne mase ($<25 \text{ kg/m}^2$, $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ i $>30 \text{ kg/m}^2$) u žena u postupku izvantjelesne oplodnje na količinu gonadotropina potrebnih za stimulaciju ovulacije. Uz to uspoređujemo broj dobivenih jajnih stanica, utjecaj indeksa tjelesne mase na zrelost dobivenih jajnih stanica, stupanj oplodnje u odnosu na različiti indeks tjelesne mase, te stupanj razvoja zametaka do stadija blastociste u odnosu na različiti indeks tjelesne mase.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

3.1.1. Klinička obrada ispitanika

Istraživanje je uključivalo ukupno 40 ispitanica. Sve ispitanice koje su sudjelovale u istraživanju liječile su neplodnost u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

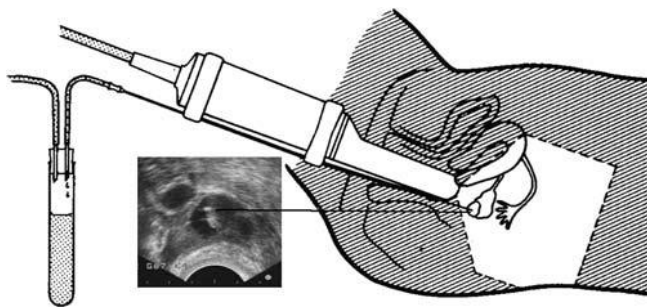
Ispitanice smo podjelili u tri skupine prema BMI, $<25 \text{ kg/ m}^2$ (normalna težina), $25\text{-}30 \text{ kg/ m}^2$ (prekomjerna težina) i $>30 \text{ kg/ m}^2$ (pretilo).

3.2. Priprema prije aspiracije folikula

Dan prije aspiracije folikula potrebno je pripremiti četverozdenačne ploče za *in vitro* fertilizaciju za kulturu gameta. Pripremaju se u besprašnoj komori pomoću sterilnih Pasteurovih pipeta tako da se u svaku jažicu dodaje 0,5 ml medija za oplodnju te 0,5 ml ulja za staničnu kulturu. Četverozdenačne ploče se označe kako bismo znali koji medij za kultivaciju sadrže. Posudice se odlažu u inkubator s 6,0 % CO_2 , 37°C . Na dan aspiracije u besprašnoj komori se pripremaju Petrijeve posudice s centralnim bazenom za prikupljanje i ispiranje jajnih stanica, na način da se pomoću sterilne Pasteur-ove pipete dodaje 1 ml medija za ispiranje gameta. Posudice se odlažu u stolni inkubator na 37°C (Mačaš, 2004).

3.3. Izolacija jajnih stanica

Postupak započinje identifikacijom pacijentice od strane medicinske sestre i liječnika, nakon čega pacijentica dobiva anesteziju. Transvaginalnim ultrazvukom vrši se aspiracija oocita. Danas se koristi ultrazvučna oprema s vaginalnim kateterom, koja je sigurniji način aspiracije folikula kroz vaginalni kanal. Vaginalni kateter postoji u više veličina i bitno je odabrati pravilni kateter kako bi postupak uspio. Na ultrazvuku se nalazi kateter s iglom pomoću kojeg se vrši aspiracija (Gardner, 2007).



Slika 14. Shematska ilustracija aspiracije jajnih stanica. Igla se uvodi na vaginalni kateter. Ultrazvučna slika pokazuje punkciju folikula. (preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

3.4. Identifikacija jajne stanice

Nakon ultrazvučne aspiracije jajnog folikula, epruveta s folikulskom tekućinom prenosi se u laboratorij koji se nalazi u neposrednoj blizini operacijske dvorane. Folikulaska tekućina koja je žućkaste boje ili sukrvava, izlije se u sterilnu posudicu i pretražuje stereomikroskopom. Pomoću sterilnog plastičnog nastavka kanila G20 (1,0 x 32 mm) sa špricom od 1 ml izoliraju se jajne stanice, a potom prebacuju u posudice s medijem pripremljenim za ispiranje jajnih stanica te kratkotrajno pohranjuju u grijani stolni inkubator. Odmah nakon aspiracije jajne stanice, na temelju morfoloških svojstava *kumulusa ooforusa* i *korone radijate* procjenjuje se stupanj zrelosti jajne stanice (Gardner, 2007).

Dva sata nakon aspiracije, jajne stanice prenose se u Petrijevu zdjelicu s 10 % otopinom hijaluronidaze.

3.5. Obrada sjemena

Sjeme se dobiva masturbacijom u sterilnu posudu otprilike jedan sat prije ispitivanja njegove kvalitete. Pacijentu se preporučava seksualna apstinencija koja ne smije biti kraća od dva dana, ili duža od pet dana. Za masturbaciju pacijentu se osigurava posebna prostorija u kojoj se on osjeća opušteno (Mačaš, 2004).

U prvih trideset minuta nakon ejakulacije, sjeme prelazi u tekuće stanje dodatkom proteaza i amilaze. Ako je ono u tom vremenu još uvijek u koaguliranom stanju, likvifikacija se ubrzava uzastopnim pipetiranjem ili dodatkom amilaze. Volumen ejakulata u normalnim prilikama iznosi od 2 do 6 mL (Mačaš, 2004).

3.5.1. Određivanje ukupnog broja i broja pokretnih spermija u ejakulatu

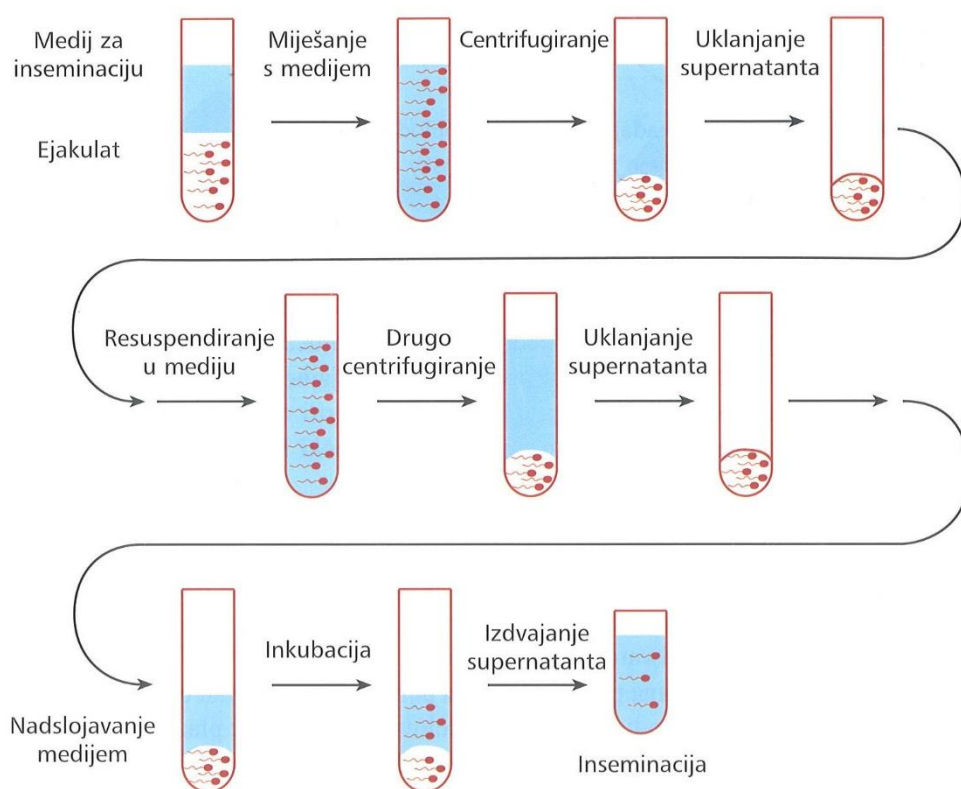
Ukupni broj spermija u ejakulatu određuje se u Maklerovoj komorici za brojanje spermija. Rezultati oplodnje jajne stanice u *in vitro* uvjetima ovisi najviše o pokretljivosti spermija. Pokretljivost spermija razvrstava se u četiri kategorije koje su strogo definirane standardima WHO. Tipom A pokretljivosti kreću se najbrži spermiji po putanji koja je ravna crta. Spermiji tipa B su sporiji, a putanja njihova kretanja je zavinuta krivulja. Tipom C pokretljivosti su spermiji koji se miču na mjestu, dok su svi nepokretni spermiji tipa pokretljivosti D (Magli i sur, 2012). Princip metode temelji se da računarski sustav može razlikovati spermij od drugih stanica po njegovoj veličini i obliku njegove glave (Gardner, 2007).

3.5.2. Određivanje morfoloških karakteristika spermija

Za određivanje morfoloških karakteristika spermija koriste se Krugerovi kriteriji. Ono zahtjeva da se analiza obavlja od strane dva tehničara sa najmanje dvije stotine stanica na jednom predmetnom stakalcu. Također se koristi mikrometar za određivanje dimenzija glave spermija. Poprečni promjer glave spermija iznosi 2,5 do 3,5 μm , a izduženi 5 do 6 μm .

3.5.3. Obrada spermija postupkom isplivavanja spermija

Uzimamo 1 ml nativnog uzorka ejakulata i mješamo ga s 5 mL medija za inseminaciju, te centrifugiramo 10 minuta na 300 g. Nakon centrifugiranja supernatant odstranimo, a talog je bogat spermijima. Talog resuspendiramo u mediju za inseminaciju i ponovo centrifugiramo 10 minuta na 300 g. Nakon centrifugiranja tekući dio opet odstranimo, a u talog dodajemo 1 mL svježeg medija za inseminaciju, te epruvetu zajedno sa spermijima ostavljamo 60 do 90 minuta u kosom položaju u inkubatoru. Tijekom inkubacije na dnu epruvete su nepokretne stanice, a na vrh isplivaju najpokretniji spermiji. Tehnika je poznata pod nazivom swim up (Slika 15) (Mačaš, 2004).



Slika 15. Dijagramski prikaz postupka obrade spermija swim up tehnikom (preuzeto sa: Mačaš, 2004)

3.6. Priprema za ICSI postupak

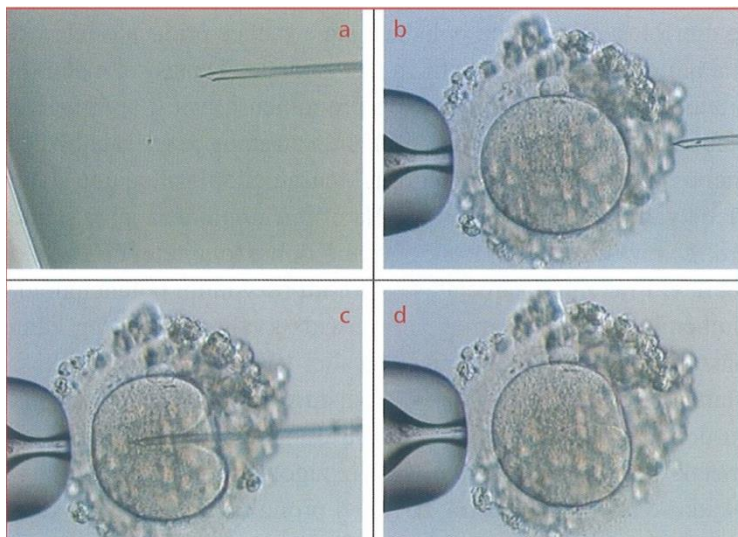
Pola sata prije izvođenja ICSI postupka priprema se Petrijeva posudica sa kapljicama polivinilpirolidona (PVP) i medija. U gornji dio poklopca posudice stavljaju se tri kapi od 10 μ l PVP-a ispod kojih su raspoređene kapi od 7 μ l HEPES medija. Tako pripremljene kapljice preliju se uljem za staničnu kulturu i posudica se odlaže u stolni inkubator na 37°C do izvođenja ICSI postupka (Gardner, 2007). Grijača ploča invertnog mikroskopa s mikromanipulatorima uključi se pola sata ranije kako bi postigla temperaturu od 37°C. Mikromanipulatori mikroskopa moraju biti u centralnom položaju. Na lijevi nosač mikropipete pričvrsti se staklena mikropipeta za pridržavanje jajne stanice (holding mikropipeta). Iz desnog nosača mikropipete prvo se istisne određena količina ulja kako bi se eliminirali eventualni mjehurići zraka nakon čega se na nosač postavlja staklena mikropipeta za intracitoplazmatsku injekciju (mikroinjekcijska pipeta). Pod najmanjim povećanjem mikropipete se namještaju na način da se postave u centar vidnog polja u jednakoj ravnini (Mačaš, 2004).

3.6.1. ICSI postupak

Intracitoplazmatska injekcija spremija (*engl. Intracytoplasmic sperm injection, ICSI*) metoda je koja se koristi kada imamo mali broj, lošu mobilnost i abnormalnu morfologiju spermija. Danas se ICSI koristi za liječenje azoospermije, astenoospermije, visoki titar antispermalnih antitijela, obstrukcija u oba ejakulatorna duktusa, necrozospermiju (Gardner, 2007).

ICSI se bazira na mikromanipulaciji jajnih stanica i spermatozoa, gdje se jedan spermatozoon sa funkcionalnih genomom direktno injektira u ooplazmu. Uspješnost ICSI postupka ovisi o ovarijskoj stimulaciji, koja se sastoji od kombinacije hormon koji oslobađa gonadotropine GnRH agonista i antagonista, ljudskog menopauzalnog hormona (*engl. Human menopausal hormone, hMG*) ili rekombinantnog folikulo-stimulirajućeg hormona (recFSH) i humanog korionskog gonadotropina (*engl. Human chorionic gonadotropin, hCG*), koji omogućuju stvaranje kumulus-oocita kompleksa. GnRH agonisti dovode do povećanja FSH i potiču razvoj folikula. Ovulacija se inducira sa hCG-om koji dovodi do povećanja serumskog estradiola. 36 sati nakon primanja hCG radi se aspiracija jajnih stanica (Gardner, 2007).

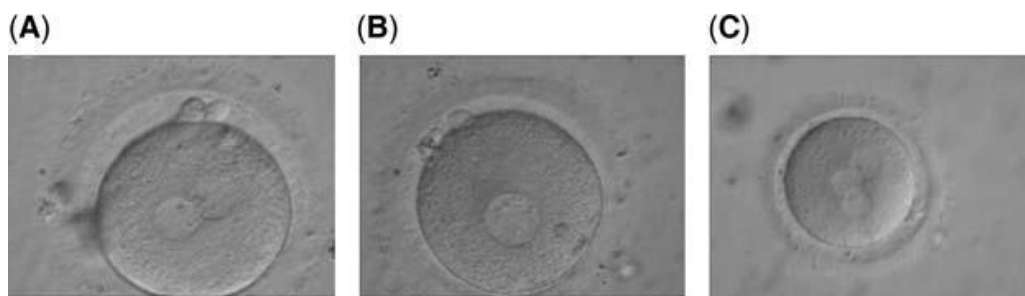
Jajne stanice predodređene za oplodnju ICSI postupkom podvrgavaju se procesu denudacije (odstranjuju se korona stanice i kumulus koje okružuju jajnu stanicu). To omogućuje precizno injektiranje jajne stanice, ali i procjenu zrelosti jajne stanice, što je jako bitno za ICSI postupak (Gardner, 2007). Nakon inkubacije od jedan sat nakon denudacije, jajne stanice s polarnim tjelešcem (MII – metafaza druge mejotske diobe) u besprašnoj komori s grijanom plohom stavljaju se u kapi medija u pripremljenoj Petrijevoj posudici. Uzima se 1-4 μ l obrađenog sjemeni, ovisno o koncentraciji pokretnih spermija u obrađenom uzorku. U kapljici PVP-a s uzorkom sjemeni odabire se odgovarajući spermij koji se potom imobilizira udarcem mikroinjekcijske pipete u predjelu vratne regije. Imobilizirani spermij aspirira se u mikropipetu. Petrijeva posudica sa jajnim stanicama i spermijima stavlja se na grijanu ploču invertnog mikroskopa s mikromanipulatorima. Pipetom za pridržavanje jajne stanice se jajna stanica učvrsti na način da je polarno tjelešce na poziciji 12 ili 6 sati. Spermij se dovede na vrh mikropipete te se jajna stanica ubode na poziciji 3 sata. Nakon uboda mikroinjekcijska pipeta prodire kroz zonu pelucidu i oolemu te ulazi u citoplazmu nakon čega se aspirira mala količina citoplazme a zatim injicira i citoplazma i spermij u jajnu stanicu (Slika 16). Nakon provedenog ICSI postupka jajne stanice se pomoću kapilara promjera 170 μ m prebacuju u prethodno označene četveroždne ploče za kulturu zigota i ranih zametaka te se odlažu u inkubator s 6,0 % CO_2 i 37°C gdje ostaju do ocjene fertilizacije sljedećeg dana (Mačaš, 2004).



Slika 16. Postupak intracitoplazmatske injekcije spermija. (A) Selekcija odgovarajućeg spermija i imobilizacija udarcem mikroinjekcijske pipete u predjelu vratne regije. (B) Fiksacija zrele jajne stanice s polarnim tjelešcem koje je na poziciji 6 sati. (C) . Spermij se dovede na vrh mikropipete te se jajna stanica ubode na poziciji 3 sata. (D) Jedan spermij se uvodi u cjenar ooplazme (preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

3.6.2. Ocjena fertilizacije nakon oplodnje jajnih stanica ICSI metodom

Ocjena morfologije i provjera fertilizacije jajnih stanica/zigota podvrgnutih ICSI metodom vrši se na invertnom mikroskopu s grijanom plohom pri povećanju od 200×. Na obrascu za metode asistirane reprodukcije bilježi se morfologija (nezrela/zrela/atretična/prisustvo polarnih tjelešaca, prisustvo pronukleusa, izgled citoplazme) i oplodnja pojedine jajne stanice/zigote. Normalne oocite se smatraju one koje imaju dva polarna tjelešca sa dva jasno vidljiva pronukleusa (2-NP) (Slika 17). Kao što je vidljivo na slici može doći i do abnormalne fertilizacije, tako da jajna stanica ima jedan pronukleus (1-NP). Razlog tomu su mehanički ili kemijski faktori. Također može doći i do pojave tri pronukleusa (3NP) uglavnom uzrokovan neuspješnim istiskivanjem sekundarnog polarnog tjelešca za vrijeme fertilizacije. Embrio sa jednim ili tri pronukleusa se ne uzima za transfer (Mačaš, 2004).



Slika 17. Ishod fertilizacije nakon ICSI postupka. (A) oocyte sa dva polarna tjelešca sa dva jasno vidljiva pronukleusa (2-NP). (B) Jajna stanica sa jednim pronukleusom (1-NP). (C) Jajna stanica sa tri pronukleusa (3-NP) (preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

Nakon analize, oplođene jajne stanice prebacuju se u označene četverozdenačne ploče sa medijem za kulturu zigota i ranih zametaka pripremljene prethodnog dana te se odlažu u inkubator s 6,0% CO₂ i 37°C na daljnju kultivaciju (Gardner, 2007).

3.7. Priprema za ocjenu *in vitro* fertilizacije

Dan ranije pripremaju se četverozdenačne ploče za *in vitro* fertilizaciju za kulturu zigota i ranih zametaka na način da se pomoću sterilnih Pasteur-ovih pipeta doda 0,5 ml medija za ranu diobu zametaka i 0,5 ml ulja za staničnu kulturu. Posudice se odlažu u inkubator sa 6,0 % CO₂, 37°C. Prije izvođenja ocjene fertilizacije potrebno je zagrijati plohe besprazne komore i invertnog mikroskopa kako bi postigle temperaturu od 37°C (Mačaš, 2004).

3.7.1. Ocjena fertilizacije nakon oplodnje jajnih stanica IVF metodom

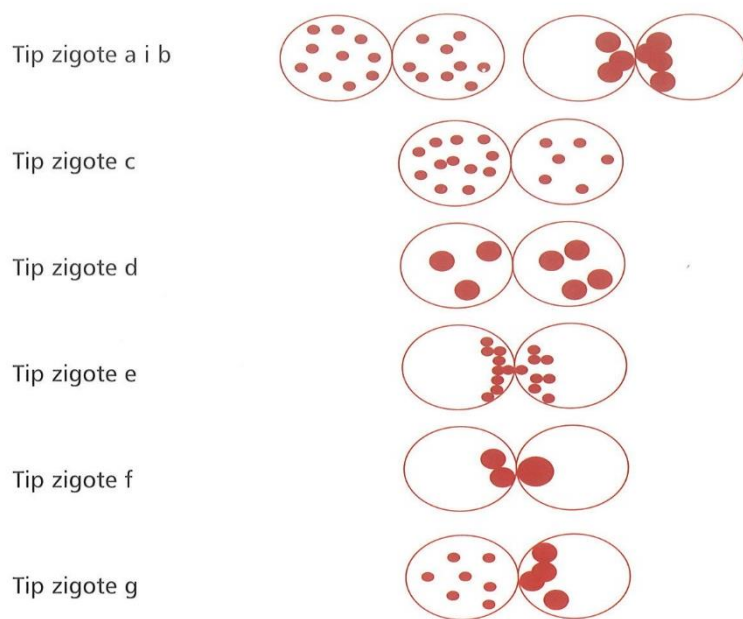
U bespraznoj komori na stereo mikroskopu s grijanom plohom sa jajnih stanica/zigota se odstranjuju ostatci granuloza stanica mehaničkim putem pomoću kapilara promjera 140 µm. Zatim se ocjena morfologije i provjera fertilizacije vrši na invertnom mikroskopu s grijanom plohom pri povećanju od 200× (Mačaš, 2004). Na obrascu za metode asistirane reprodukcije bilježi se morfologija (nezrela/zrela/atretična/prisustvo polarnih tjelešaca, prisustvo pronukleusa, izgled citoplazme) i oplodnja pojedine jajne stanice/zigote. Nakon analize, oplođene jajne stanice prebacuju se u označene četverozdenačne ploče sa medijem za kulturu zigota i ranih zametaka pripremljene prethodnog dana te odlažu u inkubator s 6,0% CO₂ i 37°C na daljnju kultivaciju (Mačaš, 2004). Rezultat se također bilježi u laboratorijskoj Knjizi postupaka metoda pomognute oplodnje te u elektronsku bazu podataka za postupak izvantjelesne oplodnje.

3.8. Kultura i ocjena ranih zametaka

18-20 h nakon *in vitro* inseminacije standardnim postupkom, s površine jajne stanice odstranjuju se stanice *kumulusa* i *korone radijate*. To radimo mikrokapilarna promjera 150-200 um, gdje naizmjenično aspiramo oocite, dok se ne oslobodi veći dio stanica *korone radijate*. Ako je stanica normalno oplodena, u citoplazmi vidimo muški i ženski pronukleus, a u perivitelinom prostoru dva polarna tjelešca (Mačaš, 2004).

48 i 72 sata od punkcije i aspiracije folikula vrši se ocjena ranih zametaka na invertnom mikroskopu s grijanom plohom pri povećanju od 200x. Ocjena morfologije zametaka bilježi se na obrascu za metode asistiranu reprodukciju - dinamika razvoja zametaka, staničnost zametaka te prisustvo fragmentacije u zametku. Na temelju morfoloških karakteristika može se predvidjeti kvaliteta budućeg embrija. Na primjer, oplodena jajna stanica tipa *A* ili *B* (Slika 18) razvija se u zametak dobre kvalitete, dok se zigote tipa *C*, *D*, *E*, *F* razvijaju u zametak sa slabijim razvojnim potencijalom (Mačaš, 2004).

Drugi čimbenik pomoću kojeg se predviđa kvaliteta budućeg zametka je opći izgled citoplazme oplodene jajne stanice. Na Slici 19. prikazana je zigota koja ima dobar razvojni potencijal jer su joj stanični organeli nakupljeni u središtu jajne stanice. Najbolje je kada se oba parametra, tj. tipovi pronukleusa *A* i *B* vide zajedno u zigoti s nehomogenim tipom citoplazme (Mačaš, 2004).

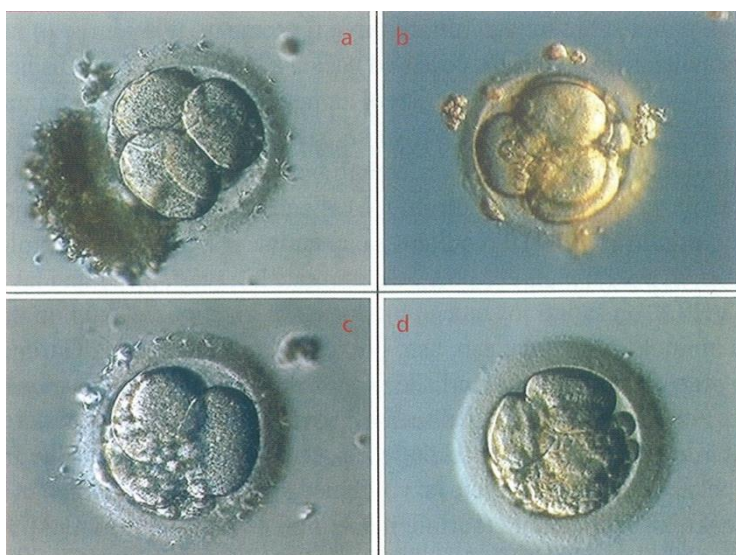


Slika 18. Morfološke karakteristike pronuklearnog stadija u čovjeka: (A) optimalan tip zigote gdje jedvadesetak manjih nukleola jednakomjerno raspoređeno unutra muškog i ženskog pronukleusa; (B) optimalan tip zigote s 3 do 4 većih neukleola raspoređenih duž crte spajanja pronukleusa; (C, D, E, F) zigote čiji pronuklearni izgled ne upućuje na optimalnu kvaliteteiu budućeg spremija (preuzeto sa: Mačaš, 2004)



Slika 19. Normalno oplodena jajna stanica čovjeka s velikim razvojnim potencijalom (Preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

72 sata nakon punkcije i aspiracije folikula, odnosno trećeg dana kultivacije ocjenjujemo zametke u besprašnoj komori na stereo mikroskopu s grijanom plohom. Najčešće se vide zametci s 4, a rijede s 2 -i 6, ili 3 i 5 stanica (Gardner, 2007). Najbolje su kvalitete zameci s pravilnim blastomerama i bez fragmentacije u perivitelinom prostoru (Slika 20). Slabiji zametci su s 20% fragmenata, a najslabiji s 50 i više od 50% fragmenata. Uz morfologiju gledamo i dinamiku razvoja, koja mora biti brza. S druge strane, morfološki nepravilni zameci sa sporom dinamikom imaju relativno mali razvojni potencijal. Nakon ocjene morfologije zametke prebacujemo u obilježene četverozenačne ploče za kulturu blastocista pripremljene prethodnog dana. Ploče sa zamecima se vraćaju u inkubator s 6,0 % CO₂ i 37°C do prijenosa zametaka u maternicu žene istog dana ili do četvrtog ili petog dana kultivacije, ovisno o procjeni embriologa (Mačaš, 2004).

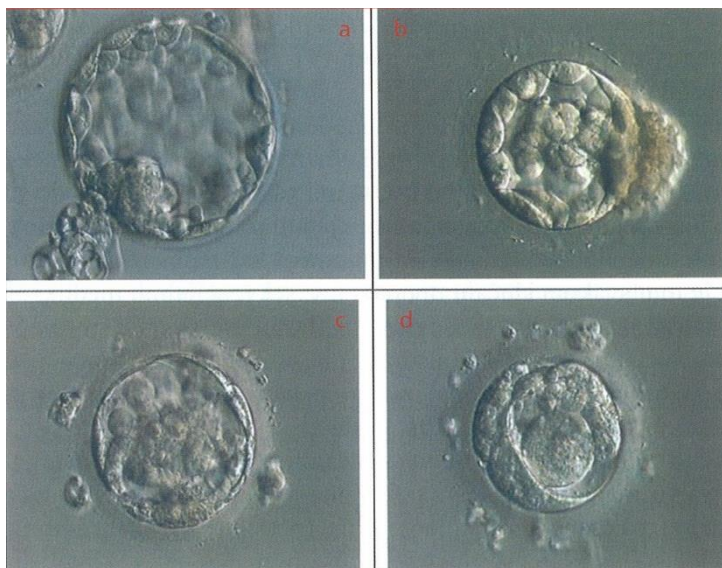


Slika 20. Četiri morfološki osnovna tipa ranog zametka u čovjeka: (A) pravilno oblikovani embrij; (B) embrij s 20% anuklearnih fragmenata; (C) embrij s 20-50% fragmenata; (D) nepravilno oblikovan embrij s više od 50% anuklearnih fragmenata. (preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

Ploče sa zamecima se pohranjuju nazad u inkubator do prijenosa zametaka u maternicu žene istog dana. Ocjena morfologije svih razvojnih stadija se bilježi u obrazac za metode asistiranu reprodukciju, u laboratorijsku Knjigu postupaka metoda pomognute oplodnje te u elektronsku bazu podataka za postupak izvantjelesne oplodnje.

3.9. Kultura i ocjena blastocista

U slučaju kada se kultura zametaka nastavlja do četvrtog ili petog dana kulture odnosno do razvoja zametaka do stadija morule ili blastociste, praćenje i ocjena morfologije zametaka odvija se 96 i 120 sati nakon aspiracije. 120 sati nakon aspiracije folikula, tj. petog dana kulture, nakon ocjene morfologije zametci se u besprašnoj komori na stereo mikroskopu s grijanom plohom prebacuju u nove obilježene četverostrane ploče za kulturu blastocista pripremljene prethodnog dana (Gardner, 2007). Na Slici 21 prikazana je morfološki normalno razvijena blastocista. Ona ima veliku središnju šupljinu ili blastocel, u kojem se nalazi embrionalni čvorić ili embrioblast (Mačaš, 2004). Zona pelucida je tanka i cjelovita, i nekad se vide stanice trofoblasta. Takve blastociste mogu inducirati trudnoću. Na slici 14. prikazana su preostala tipa blastociste koje zbog slabije kvalitete rijetko kada induciraju trudnoću (Magli i sur., 2012).



Slika 21. Četiri tipa humane blastociste: (A) normalni tip blastociste sa ekspaniranim blastocelom; (B) neekspanirani tip blastociste, (C) tip blastociste s rudimentalnim blastocelom; (D) tip blastociste sa dva do tri manja pseudoblastocela. (Preuzeto sa: Magli i sur., 2012)

3.10. Prijenosa zametaka u materijšte ili embriotransfer (ET)

Prijenos zametaka može se izvršiti u različitim stadijima razvoja zametka:

- prijenos ranih zametaka vrši se 48-72 sata od punkcije i aspiracije folikula
- prijenos morula vrši se 96 sati od punkcije i aspiracije folikula
- prijenos blastocista vrši se 120 sati od punkcije i aspiracije folikula

Nakon identifikacije, pacijentica se smješta na ginekološki stol u litotomni položaj. Ginekolog uz asistenciju medicinske sestre uvodi instrumente i fiziološkom otopinom ispiru rodnicu i vrat maternice pomoću sterilne gaze i pincete. Nakon ispiranja, rodnica i vrat maternice se suši sterilnom gazom. Za prijenos zametaka koristi se meki kateter za transfer embrija s tvrdim vanjskim kateterom i atraumatskim vrhom minimalne duljine 23 cm (Gardner, 2007). Vanjski kateter se uvodi kroz kanal vrata maternice do oznake ovisno o prethodno izmjerenoj dužini vrata maternice. Ukoliko je prolazak otežan, vrat maternice se prihvaća za to predviđenim hvataljkama i povlači da bi se os vrata maternice-maternica ispravila. Nakon uvođenja vanjskog katetera, ginekolog daje znak embriologu da je spreman za uvođenje mekog katetera sa zamecima. Embriolog tada na unutarnji kateter postavlja inzulinsku špricu od 1 ml te pažljivo u vršni dio katetera aspirira mediju dužini od 1 mm, zatim 0,5 mm zraka, zameci/morule/blastociste s medijem u dužini od 1 mm, 0,5 mm zraka, te hranilište u dužini od 1 mm. Unutarnji kateter se tada uvodi u vanjski kateter do graničnika te se laganim pritiskom na klip šprice injiciraju zameci u materijšte. Nakon prijena zametaka/morula/blastocista uklanjaju se zajedno vanjski i unutarnji kateter te se ispiranjem u mediju u zdencima četverozdenačne ploče pregledava njihov sadržaj čime se provjerava da li su svi zameci/morule/blastociste prenešeni u materijšte. Nakon postupka pacijentica ostaje ležati 2 sata. Zahvat se bilježi u laboratorijskoj Knjizi postupaka metoda pomognute oplodnje, a podaci o pacijentima bilježe se u obrascu za metode asistiranu reprodukciju te u elektronsku bazu podataka za postupak izvantjelesne oplodnje (Mačuš, 2004).

3.11. Statistička obrada

Podaci su obrađeni u računalnom programu za statističku obradu R (inačica 3.2.3., www.r-project.org). Kategorijski podaci prikazani su pomoću apsolutnih i relativnih frekvencija, dok su numerički podaci kod kojih je izostala normalnost razdiobe, prikazani pomoću medijana, prve i treće kvartile. Normalnost razdiobe ispitana je pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Razlike među kategorijskim podacima ispitane su pomoću binomialnog, Fisherovog egzaktnog i χ^2 testa, dok su razlike numeričkih varijabli, koje ne prate normalnost distribucije ispitani pomoću Kruskal Wallisovog testa, nakon čega je, u slučaju postojanja statistički značajnih razlika učinjen Tukeyjev post hoc test. Analiza povezanosti varijabli učinjena je pomoću Kendallovog tau korelacijskog testa. Razina statističke značajnosti određena je s $p < 0.05$.

4. REZULTATI

Tablica 1. prikazuje opće podatke o ispitanicama. Sve numeričke varijable su prikazane pomoću medijana i interkvartilnog raspona. Medijan dobi iznosio je 33 godine, a BMI-ja 25.6 kg/m². Zastupljenost ispitanica s vrijednostima BMI-ja manjim od 25 jednaka je onima s vrijednostima između 25 i 30, a iznosila je 37.5 %, dok je učestalost ispitanica s vrijednostima BMI većom od 30 iznosila 25 % (p=0.535). Medijan broja dobivenih oocita je iznosio 7.5, broja MII oocita 6.5, broja oplodjenih oocita 5.5, a stupnja oplodnje 95%. Medijan broja zametaka iznosio je 5.5, broja blastocisti 3, stupnja blastupacije 60 %, a broja ET zametaka 1. Statistički značajna razlika pronađena je u učestalosti pozitivnih β -HCG vrijednosti, koje su tek u 32.5 % slučajeva bile pozitivne. Uspoređujući vrstu oplodnje, podjednako je korištena ICSI (47.5%) i IVF (52.5%) metoda (p=0.875).

Tablica 1. Prikaz općih podataka o ispitanicama

		mdn (25%-75%)	
Dob		33 (30-35)	
BMI		25.6 (21.5-29.4)	
Broj dobivenih oocita		7.5 (5-10)	
Broj MII oocita		6.5 (4-8)	
Broj oplodjenih oocita		5.5 (3.5-7)	
Stupanj oplodnje (%)		95 (80.5-100)	
Broj zametaka		5.5 (3-7)	
Broj blastocisti		3 (2-5)	
Stupanj blastulacije (%)		60 (45-80)	
br. ET zametaka		1 (1-2)	
		n (%)	p*
β-HCG	poz	13 (32.5%)	0.038
	neg	27 (67.5%)	
Vrsta oplodnje	ICSI	19 (47.5%)	0.875
	IVF	21 (52.5%)	
BMI skupina	<25	15 (37.5%)	0.535†
	25-30	15 (37.5%)	
	>30	10 (25%)	

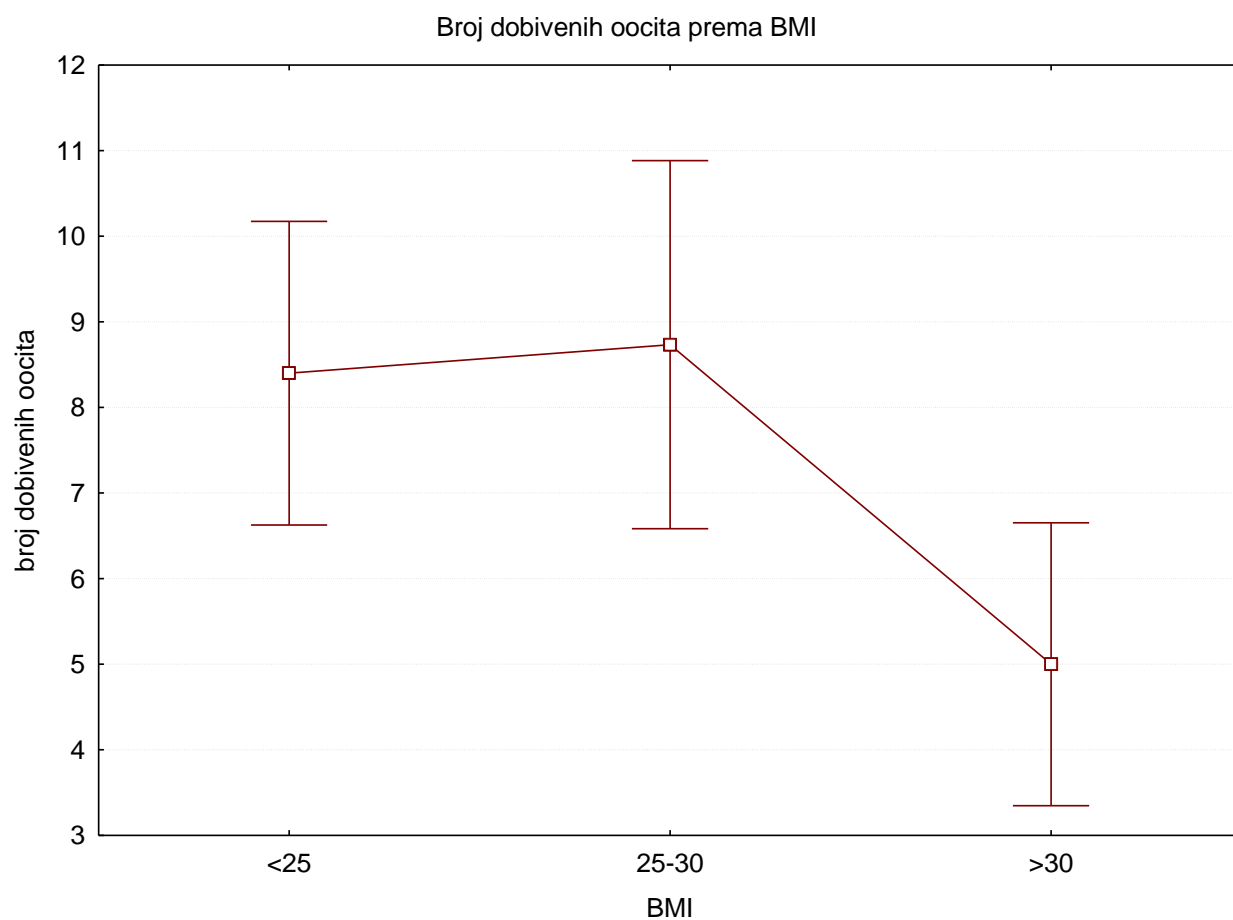
*Binomialni test, † χ^2 test

U Tablici 2. se nalazi prikaz usporedbe najznačajnijih varijabli prema kategorijama BMI. Statistički značajna razlika pronađena je u broju dobivenih oocita ($p=0.015$), broju MII oocita ($p=0.004$), broju oplodjenih oocita ($p=0.008$), broju zametaka ($p=0.008$) te broju ET zametaka ($p<0.001$). U svim varijablama statistički su značajno niže vrijednosti brojeva oocita i zametaka bile u ispitanica s BMI vrijednostima većim od 30, dok je broj ET zametaka bio statistički značajno niži u osoba s BMI vrijednostima nižim od 25 (Slika 22,23,24,25).

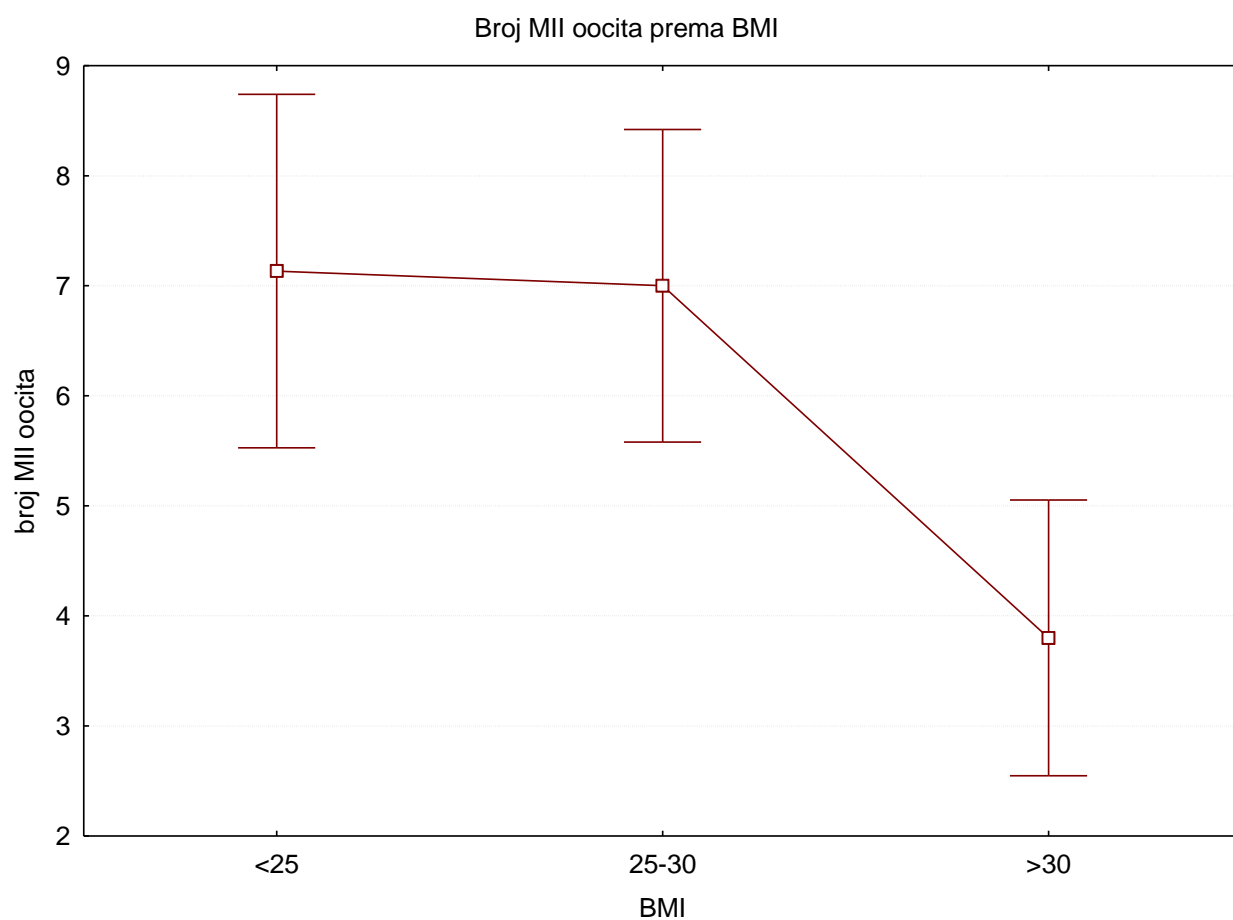
Tablica 2. Usporedba najznačajnijih varijabli prema stupnju BMI

		BMI			p*
		<25	25-30	>30	
Dob		33.13±3.09	33.13±3.87	32.3±4.66	0.96
β-HCG	Poz	6 (40%)	4 (26.67%)	3 (30%)	0.767†
	Neg	9 (60%)	11 (73.33%)	7 (70%)	
Broj dobivenih oocita		8 (7-11)	9 (6-11)	5.5 (3-6)	0.015
Broj MII oocita		7 (5-9)	7 (4-9)	3.5 (3-6)	0.004
Broj oplodjenih oocita		6 (5-9)	6 (4-8)	3 (2-5)	0.008
Stupanj oplodnje (%)		100 (86-100)	87 (75-100)	100 (67-100)	0.254
Broj zametaka		6 (5-9)	6 (4-8)	2.5 (2-5)	0.008
Broj blastocisti		3 (3-5)	3 (2-5)	2.5 (1.5-4.5)	0.675
Stupanj blastulacije (%)		50 (50-71)	62 (43-100)	75 (33.5-100)	0.953
br. ET zametaka		1 (1-1)	2 (1-2)	2 (2-2)	<0.001

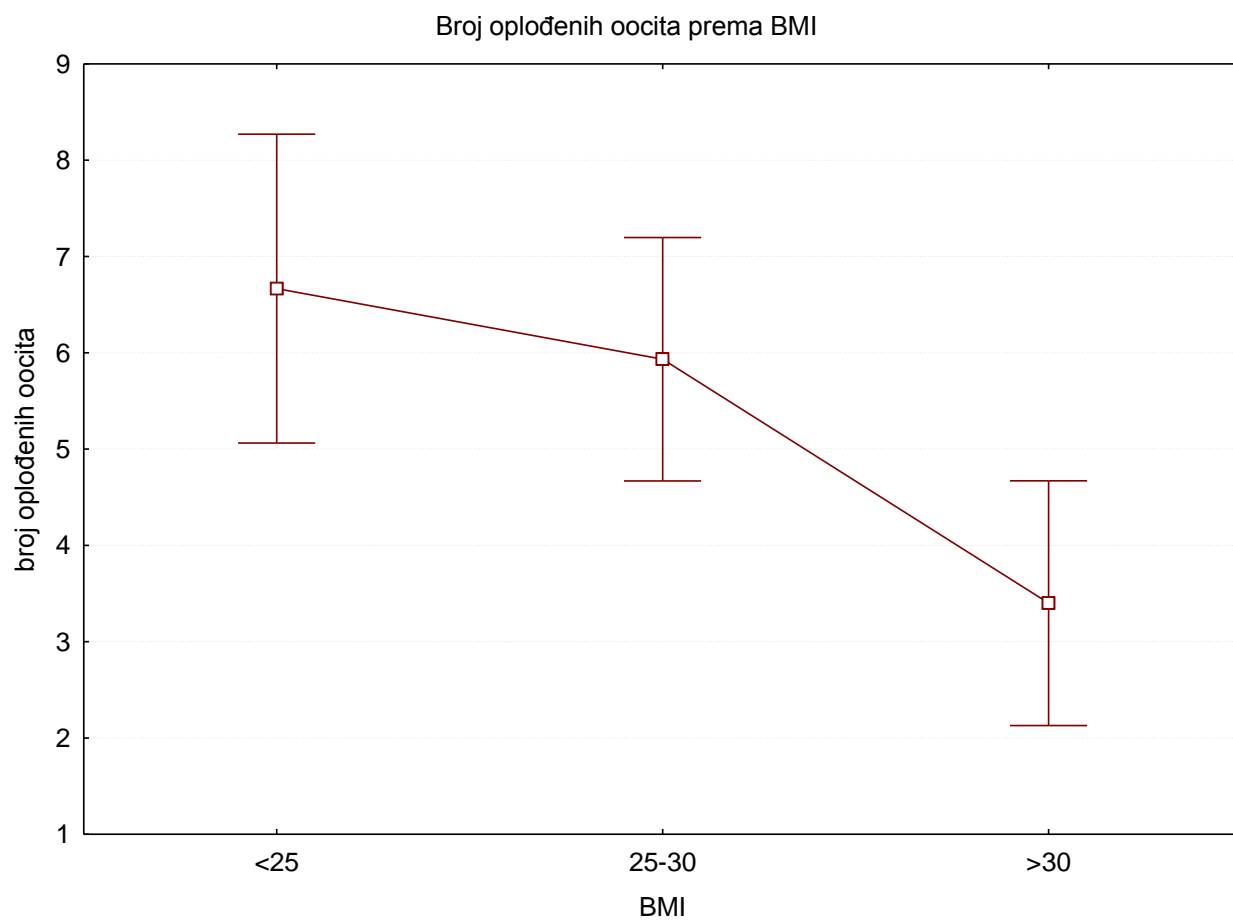
*Kruskal Wallisov test, †Fisherov egzaktni test



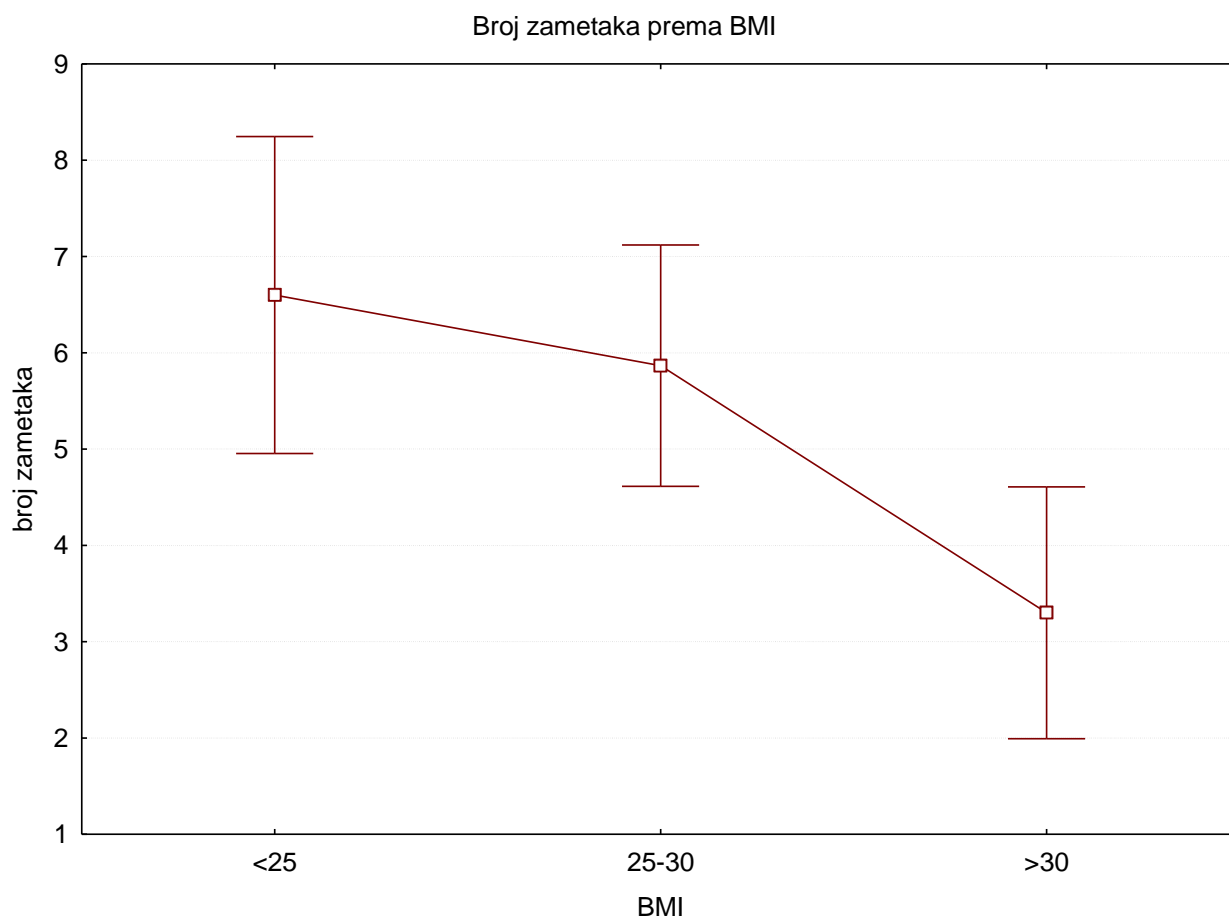
Slika 22. Broj dobivenih oocita prema BMI. Vidimo da je u srednjoj skupini (BMI 25-30) dobiveno najviše jajnih stanica, dok smo u skupini gdje je BMI >30 dobili najmanje jajnih stanica.



Slika 23. Broj MII oocita prema BMI. U skupini gdje je BMI < 25 najviše jajnih stanica je došlo do MII, dok je u skupini gdje je BMI >30 najmanje jajnih stanica došlo do MII.



Slika 24. Broj oplođenih oocita prema BMI. Najviše oplođenih jajnih stanica imamo u skupini gdje je BMI <25, a najmanje u skupini gdje je BMI >30.



Slika 25. Broj zametaka prema BMI. Najviše zametaka dobili smo u skupini gdje je BMI <25, a najmanje u skupini gdje je BMI >30.

Tablica 3. sadrži prikaz korelacijske analize. Pozitivne korelacije su pronađene između broja dobivenih oocita i MII oocita ($\tau=0.795$), oplođenih oocita ($\tau=0.721$), broja zametaka ($\tau=0.731$), broja blastocisti ($\tau=0.45$). Pozitivna korelacija je pronađena između broja MII oocita i oplođenih oocita ($\tau=0.888$), broja zametaka ($\tau=0.883$), broja blastocisti ($\tau=0.521$), kao i između broja oplođenih oocita i broja zametaka ($\tau=0.982$), broja blastocisti ($\tau=0.562$). Pozitivne su korelacije pronađene i između broja zametaka i broja blastocisti ($\tau=0.534$) te broja blastocisti i stupnja blastulacije ($\tau=0.376$).

Statistički značajne negativne slabe korelacije pronađene su između BMI i broja dobivenih oocita ($\tau=-0.261$), broja MII oocita ($\tau=-0.315$), broja oplođenih oocita ($\tau=-0.333$), broja zametaka ($\tau=-0.334$).

Tablica 3. Prikaz korelacijske analize najznačajnijih varijabli

	N dobivenih oocita	N MII oocita	N oplodjenih oocita	Stupanj oplodnje	N zametaka	N blastocisti	Stupanj blastulacije	BMI
N dobivenih oocita	1.000							
N MII oocita	0.795	1.000						
N oplodjenih oocita	0.721	0.888	1.000					
Stupanj oplodnje	-0.117	-0.028	0.162	1.000				
N zametaka	0.731	0.883	0.982	0.148	1.000			
N blastocisti	0.450	0.521	0.562	0.027	0.534	1.000		
Stupanj blastulacije	-0.185	-0.163	-0.173	-0.022	-0.204	0.376	1.000	
BMI	-0.261	-0.315	-0.333	-0.132	-0.334	-0.039	0.122	1.000

5. RASPRAVA

Do danas su provedena brojna istraživanja o utjecaju indeksa tjelesne mase na reprodukciju u ljudi (Kasim i Roshdy, 2014; Nichols i sur., 2003). Ovo istraživanje pokušalo je objasniti utjecaj indeksa tjelesne mase na ishod postupka izvantjelesne oplodnje u žena. Kao i odrediti utjecaj BMI na količinu gonadotropina potrebnih za stimulaciju ovulacije, broj dobivanih jajnih stanica, zrelost jajnih stanica, stupanj oplodnje te stupanj razvoja zametka. U ovom istraživanju kao i kod autora (Kasim and Roshdy, 2014) potvrđena je smanjena mogućnost trudnoće u žena s prekomjernom težinom.

Brojna istraživanja upućuju na brojne dokaze da prekomjerna težina u žena povećava rizik za menstrualnu disfunkciju i anovulaciju, te dovodi do slabijeg razvoja folikula, manji broj jajnih stanica i slabiju stopu trudnoća (McClamrock i Howard, 2008). Nadalje, postoje istraživanja gdje nema statistički značajne razlike između BMI i trudnoće (Green i sur., 1988, Wittemer i sur., 2000). Međutim, na taj rezultat može utjecati i mršavljenje žena s prekomjernom težinom. Brewer i Balen (2010) su to potvrdili. U njihovom istraživanju uočeno je da gubitak težine kod žena s prekomjernom težinom poboljšava reproduktivne funkcije.

Brojna istraživanja pokazuju kako žene s prekomjernom težinom trebaju veće doze gonadotropina, sama stimulacija duže traje, manji je broj zrelih jajnih stanica i smanjena je kvaliteta embrija u usporedbi sa ženama s normalnom tjelesnom težinom (Ozekinci i sur., 2015). Različiti parametri dovode to toga da je optimalni odgovor na stimulaciju teže postići kod pretilih žena. Primjerice, kod žena s prekomjernom težinom jajne stanice su značajno manje, nego kod žena čija je težina normalna (Leary i sur., 2015). Wittemer i sur. (2000) su dokazali da se broj gonadotropinskih ampula povećava s BMI, odnosno da postoji statistički značajna razlika između broja gonadotropinskih ampula u različitim BMI grupama ($p < 0.01$). Ovaj fenomen je opisan kod tretmana sa klomifen citratom, gdje se povećava količina klomifen citrata povećanjem tjelesne težine. Farhi i sur. (2014) su pokazali kako nema statistički značajne razlike u dozama gonadotropina kod žena kojima je BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$ u usporedbi sa ženama kojima je BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$. U našem istraživanju je uočena pozitivna korelacija između Menopurana (75 IU) i BMI ($\tau=0.248$), a negativna između Puregona (50 IU) i BMI ($\tau=-0.2$). Međutim, nije utvrđena statistički značajna pozitivna korelacija, najvjerojatnije zbog male veličine uzorka. Budući da vrijednosti nisu statistički značajne, takav ishod je moguć na temelju slučajnosti.

Iako su neke studije uspjele dokazati da je u pretilih žena manji broj jajnih stanica (Leary i sur., 2015), drugi nisu uspjeli dokazati statistički značajnu razliku broja prikupljenih jajnih stanica kod različitih BMI grupa (Ozekinci i sur., 2015). Wittmer i sur. (2000) su pokazali da se broj prikupljenih jajnih stanica smanjuje kako se indeks tjelesne mase povećava. U našem istraživanju od ukupno 40 pacijentica prikupljeno je 285 jajnih stanica. Nadalje, možemo uočiti niže vrijednosti brojeva jajnih stanica kod ispitanica s BMI vrijednostima većim od 30.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji jajne stanice klasificiramo u pet grupa: germinala faza, metafaza I, metafaza II, zrela faza i frakturirana jajna stanica. Radi lakše analize rezultata, jajne stanice koje dođu do metafaze I i metafaze II klasificiramo kao jajne stanice „dobre kvalitete“, dok jajne stanice koje su u ostale tri faze klasificiramo kao jajne stanice „loše kvalitete“. Wittmar i sur. (2000) su pokazali da je kod pretilih žena lošija kvaliteta jajnih stanica nego kod žena s normalnom tjelesnom težinom. Također, dokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u kvaliteti jajnih stanica kod debelih i pretilih žena. Kao i u prethodnim istraživanjima (Wittmer i sur., 200; Nichols i sur., 2003), i u našem istraživanju smo također utvrdili statistički značajnu razliku u broju MII oocita ($p=0.004$) i broju oplodjenih oocita ($p=0.008$) u različitim skupinama. Također, pronađena je pozitivna korelacija između broja MII oocita i oplodjenih oocita ($r=0.888$). U prvoj skupini dobili smo 98 MII jajnih stanica, u drugoj 94, a u trećoj skupini 38 MII jajnih stanica. Iako je broj oplodjenih jajnih stanica manji od broja MII jajnih stanica, sam stupanj oplodnje je dosta visok (70-100%) u svim grupama. Iako je naše istraživanje pokazalo kako je stupanj oplodnje niži kod pretilih žena, većina drugih studija nije dokazala značajnu razliku u stupnju oplodnje između pretilih i debelih žena (Ozekinci i sur., 2015).

Uspoređujući vrstu oplodnje, podjednako je korištena je bila korištena ICSI (47.5%) i IVF (52.5%) metoda ($p=0.875$). Nakon oplodnje postoji statistički značajna razlika u broju zametaka ($p=0.008$) u različitim skupinama. Također u skupini gdje je BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ i 25-30 kg/m^2 veći je stupanj blastulacije. U trećoj skupini imamo slučajeve gdje zametci nisu došli do stadija blastociste. To je u skladu s ostalim istraživanjima koja su dokazala da povećanjem BMI smanjuje se stupanj blastulacije (McClamrock, 2008; Nichols i sur., 2003).

Iako je nekoliko embrija kod pretilih žena došlo do stadija blastociste, njihovo sazrijevanje bilo je brže nego kod žena sa normalnim BMI. Embriji pretilih žena došli su do faze morule 17 sati prije nego kod žena sa normalnom tjelesnom težinom (Leary i sur., 2015). Tu možemo zaključiti da se blastocista formira ranije kod pretilih žena, iako se sazrijevanje do

faze morule ne razlikuje. Razlog tomu je nepoznat, no Bellver i sur. (2010) su izvijestili da embriji od pretilih žena imaju isto vrijeme staničnog dijeljenja kao i kod žena sa normalnom tjelesnom težinom, i utvrdili da pretilost ima ulogu u kasnijim fazama razvitka embrija. Leary i sur. (2015) prvi su dokazali različito vremensko razvijanje embrija između pretilih i žena normalne tjelesne težine. U našem istraživanju potkrijepili smo ovu tezu gdje je transfer zametak u prvoj i drugoj skupini bio peti dan, dok je u trećoj skupini bio treći dan.

Brojna istraživanja proučavala su i učinak prekomjerne težine kod muškaraca, koji su sudjelovali u izvantjelesnoj oplodnji. Uočeno je da BMI kod muškaraca nema utjecaja među parovima koji pristupaju IVF metodi. Međutim, kod parova koji pristupaju ICSI metodi, prekomjerna težina kod muškaraca je povezana sa smanjenim izgledima za trudnoćom. Također, potrebna su još brojna istraživanja kako bi se povezanost pretilosti kod muškaraca i izvantjelesne oplodnje potvrdila (Colaci i sur., 2012). Nadalje, osim pretilosti kod žena na učinak IVF metode ima i smanjena tjelesna težina, koja također otežava izvantjelesnu oplodnju. Pokazano je da je smanjeni broj trudnoća prisutan kod ispitanica koje imaju BMI $<18 \text{ kg/m}^2$ (Ku i sur., 2006). Može se uočiti da na izvantjelesnu oplodnju i uspješnu trudnoću velik učinak ima indeks tjelesne mase. Premali ili preveliki BMI povezuje se sa smanjenom stopom pozitivne trudnoće.

Prekomjerna tjelesna težina utječe na ovulaciju, sazrijevanje oocita, razvoj endometrija, prijemčivost maternice, implantaciju i pobačaj. Stoga, uspostavljanje normalne tjelesne težine poboljšava ne samo zdravlje žene, nego poboljšava i izvantjelesnu oplodnju, kao i stopu pozitivne trudnoće (Brewer i Balen, 2010; McClamrock i Howard, 2008). Potrebna su brojna daljnja istraživanja koja će uključivati veći broj ispitanika.

6. ZAKLJUČAK

1. Utvrđena je statistički značajna razlika u broju dobivenih jajnih stanica, broju MII jajnih stanica, broju oplodjenih jajnih stanica, broju zametaka te broju ET zametaka u ispitanica s različitim BMI.
2. Utvrđene su statistički niže vrijednosti brojeva jajnih stanica i zametaka u ispitanica s BMI vrijednostima većim od 30, dok je broj ET zametaka bio statistički značajno niži u osoba s BMI vrijednostima nižim od 25.
3. Pozitivne korelacije su pronađene između broja dobivenih jajnih stanica i MII jajnih stanica, oplodjenih jajnih stanica, broja zametaka, broja blastocisti te stupnja blastulacije u žena čiji je BMI niži od 25.
4. Statistički značajne negativne korelacije pronađene su između BMI i broja dobivenih jajnih stanica, broja MII jajnih stanica, broja oplodjenih jajnih stanica, broja zametaka u žena s višim BMI

7. LITERATURA

Brewer C J, Balen A H (2010). The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*, 140(3), 347-364.

Bongioanni F, Revelli A, Gennarelli G, Guidetti D, Delle Delle Piane L, Holte J (2011). Ovarian endometriomas and IVF: a retrospective case-control study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 1.

Brown DB, Merryman DC, Rivnay B, Houserman VL, Long CA, Honea KL (2013). Evaluating a novel panel of sperm function tests for utility in predicting intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(4), 461-477.

Cha KY, Oum KB, Kim HJ (1997). Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertility and sterility*, 67(6), 985-995.

Comninou AN, Jayasena CN, Dhillon WS (2013). The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction. *Human reproduction*, 20(1), 153-174

Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, Wright DL, Toth TL, Tanrikut C, Chavarro JE (2012). Men's body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 98(5), 1193-1199.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*, 316(2), 129-139.

Gardner D (2007). In vitro fertilization. 3th ed. Cambridge University Press

Guyton AC, Hall JE (2012). Medicinska fiziologija, udžbenik. Dvanaesto izdanje. Medicinska naklada, Zagreb

Jastreboff AM, Lacadie C, Seo D, Kubat J, Giannini C, Savoye M, Sinha R (2014). Leptin is associated with exaggerated brain reward and emotion responses to food images in adolescent obesity. *Diabetes care*, 37(11), 3061-3068.

Kasim K, Roshdy A (2014). Body Mass Index and Pregnancy Outcome after Assisted Reproduction Treatment. *International journal of reproductive medicine*, 1-5

Ku SY, Kim SD, Jee BC, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Kim SH.(2006). Clinical efficacy of body mass index as predictor of in vitro fertilization and embryo transfer outcomes. *Journal of Korean medical science*, 21(2), 300-303.

Lang V, Light PE (2010). The molecular mechanisms and pharmacotherapy of ATP-sensitive potassium channel gene mutations underlying neonatal diabetes. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 3, 145.

Leary C, Leese HJ, Sturmey RG (2015). Human embryos from overweight and obese women display phenotypic and metabolic abnormalities. *Human Reproduction*, 30(1), 122-132.

Lindenmaier LB, Philbrick KA, Branscum AJ, Kalra SP, Turner RT, Iwaniec UT (2016). Hypothalamic Leptin Gene Therapy Reduces Bone Marrow Adiposity in ob/ob Mice Fed Regular and High-Fat Diets. *Frontiers in Endocrinology*, 7.

Mačaš E (2004) Medicinski pomognuta oplodnja u čovjeka. Zagreb.

Magli MC, Jones GM, Lundin K, Abbeel E Van D (2003). Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos. 1th ed. Washington, DC

Mantzoros CS, Moschos SJ (1998). Leptin: in search of role (s) in human physiology and pathophysiology. *Clinical endocrinology*, 49(5), 551-567.

McClamrock HD (2008). The great weight debate: do elevations in body mass index (BMI) exert a negative extraovarian effect on in vitro fertilization outcome?. *Fertility and sterility*, 89(6), 1609-1610.

Nichols JE, Crane MM, Higdon HL, Miller PB, Boone WR (2003). Extremes of body mass index reduce in vitro fertilization pregnancy rates. *Fertility and sterility*, 79(3), 645-647.

Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD(2014). Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium*, 55(1), 24-37.

Neto MA, de Paula Martins W, da Luz CM, Jianini BTGM, Ferriani RA, Navarro PA (2016). Endometriosis, Ovarian Reserve and Live Birth Rate Following In Vitro Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics*, 38(05), 218-224.

Ozekinci M, Seven A, Olgan S, Sakinci M, Keskin U, Akar ME, Ergun A (2015). Does obesity have detrimental effects on IVF treatment outcomes?. *BMC women's health*, 15(1), 1.

Pelzer ES, Allan JA, Waterhouse MA, Ross T, Beagley KW, Knox CL (2013). Microorganisms within human follicular fluid: effects on IVF. *PloS one*, 8(3), e59062.

Prasad S, Kumar Y, Singhal M, Sharma S (2014). Estradiol level on day 2 and day of trigger: a potential predictor of the IVF-ET success. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 64(3), 202-207.

Rhoades RA, Bell DR (2009). *Medical physiology : principles for clinical medicine*. 3rd ed. Philadelphia.

Sathya A, Balasubramanyam S, Gupta S, Verma T (2010). Effect of body mass index on in vitro fertilization outcomes in women. *Journal of human reproductive sciences*, 3(3), 135.

Sonksen P, Sonksen J (2000). Insulin: understanding its action in health and disease. *British journal of anaesthesia*, 85(1), 69-79.

Steiner DF. The Biosynthesis of Insulin. *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. 2008; 31-49

Vahratian A, Smith YR (2009). Should access to fertility-related services be conditional on body mass index?. *Human reproduction*, 24(7), 1532-1537.

Wittermer C, Ohl J, Bailly M, Bettahar-Lebugle K, Nisand I (2000). Does body mass index of infertile women have an impact on IVF procedure and outcome?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 17(10), 547-552.

Ye H, Huang GN, Zeng PH, Pei L (2009). IVF/ICSI outcomes between cycles with luteal estradiol (E2) pre-treatment before GnRH antagonist protocol and standard long GnRH agonist protocol: a prospective and randomized study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 26(2-3), 105-111.

http://static.flickr.com/31/56174461_8d71eed31d.jpg?v=0

<http://zdravlje.eu/2011/04/13/bijelo-masno-tkivo/>

<https://www.perpetuum-lab.com.hr>

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime / Prezime	Tea Petrović
Adresa(e)	Hvarska 5, 31 400 Đakovo (Hrvatska)
Telefonski broj(evi)	(+385) 981760339
E-mail	tea.petrovic20@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	01.09.1992.
Spol	Ž
<hr/>	
Radno iskustvo	
Datumi	2016.
Zanimanje ili radno mjesto	Pomoćni radnik u tiskari
Glavni poslovi i odgovornosti	-slaganje novina -umetanje različitih reklamnih proizvoda
Naziv i adresa poslodavca	Tiskara Vjesnik, Zagreb (Hrvatska)
Datumi	2016.
Zanimanje ili radno mjesto	Studentski posao
Glavni poslovi i odgovornosti	-rad s ljudima
Naziv i adresa poslodavca	Zara, Zagreb (Hrvatska)
Datumi	2015.
Zanimanje ili radno mjesto	Studentski posao
Glavni poslovi i odgovornosti	-rad s ljudima
Naziv i adresa poslodavca	H&M, Zagreb (Hrvatska)

Obrazovanje i osposobljavanje		Preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike							
	Datumi	04/07/2011–14/07/2014							
	Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje	Prvostupnik medicinsko laboratorijske dijagnostike							
	Stečene profesionalne vještine	kvalitetno analiziranje različitih bioloških uzorka, koristeći kemijske, biokemijske, molekularno biološke, imunološke, citološke i histološke metode.							
	Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija							
		Diplomski studij molekularne biologije							
	Datumi	29/09/2014–danas							
	Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje								
	Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine	- glavni predmeti: Mutageneza i karcinogeneza, Neurofiziologija, Molekularna genetika, Molekularna biologija stanice, Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji, Metode istraživanja u molekularnoj biologiji, Molekularna biljna patologija, Ekofiziologija životinja, Biološka antropologija, Fiziološki mehanizmi u toksikologiji, Fiziologija endokrinog sustava, Transplantacijska imunologija, Opća onkologija itd.							
	Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)							
Osobne vještine i kompetencije									
	Materinski jezik	Hrvatski							
	Drugi jezik(ci)	Engleski, Njemački							
	Samoprocjena								
	<i>Europska razina (*)</i>								
	<u>Engleski jezik</u>								
	<u>Njemački jezik</u>								

Razumijevanje				Govor				Pisanje	
Slušanje		Čitanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija			
C1		C1		C1		C1		C1	
B1		B2		B1		B1		B2	

(*) [Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Komunikacijske vještine Prilagođavanje timskom radu, također mogućnost samostalnog rada. Dobre komunikacijske vještine te pouzdanost i točnost u radu. Vještine stečene tijekom fakultetskog obrazovanja, izlaganjem različitih seminara, prijedloga istraživanja i slično.

Organizacijske / rukovoditeljske vještine Organizacijske vještine stečene na fakultetu, vođenjem i sudjelovanjem na određenim projektima. Sposobnost preuzimanja uloge vođe tima i upravljanje ljudima. Upoznata s takvim načinom rada.

Poslovne vještine Upoznata s radom u laboratorijima, opremom i strojevima koja se u njima nalaze. Znanje stečeno kroz brojne praktične zadatke i izradu diplomskoga rada.

Računalne vještine i kompetencije

SAMOPROCJENA

Obrada informacija	Iskusni korisnik
Komunikacija	Iskusni korisnik
Stvaranje sadržaja	Temeljni korisnik
Sigurnost	Samostalni korisnik
Rješavanje problema	Samostalni korisnik

Dovoljno dobro znanje za izradu MS Word i Excel dokumenata te PowerPoint prezentacija. Vrlo dobro se služim radom na računalu, uključujući korištenje brojnih programa i interneta te uklanjanja pogrešaka ukoliko se pojave.

Datum popunjavanja ili
zadnjeg ažuriranja životopisa

30.8.2016.